



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Efecto de la lactoferrina bovina en la invasión de
Salmonella typhimurium cepa SL 1344 a células HEp-2**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Liz Judith BARRETO ARCE

ASESOR

María Elena SALAZAR SALVATIERRA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Barreto L. Efecto de la lactoferrina bovina en la invasión de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 a células HEP-2 [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.

u23

4.
8(P)
66



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA

Siendo las 12:00 hrs. del 27 de febrero del 2017 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el Dr. Víctor Crispín Pérez e integrado por los siguientes miembros: Dra. María Elena Salazar Salvatierra (Asesora), Dra. Yadira Fernández Jeri, Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz y la Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"Efecto de la lactoferrina bovina en la invasión de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 a células HE p-2"** presentado por la Bachiller en Ciencias Biológicas **LIZ JUDITH BARRETO ARCE**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis; con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Microbiología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Muy bueno (18)

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Ciencias Biológicas **LIZ JUDITH BARRETO ARCE**, el Grado Académico de Magister en **Microbiología**

Siendo las hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las hrs. del 27 de febrero 2017.

Dr. Víctor Crispín Pérez (P.P.T.P.)
Presidente

Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P. Asoc., T.C.)
Miembro - Asesora

Dra. Yadira Fernández Jeri (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Mg. Elizabeth Liz Chávez Hidalgo (P. Aux., T.C.)
Miembro

Observaciones:

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2.1. Problema general	1
1.2.2. Problemas específicos	2
1.3. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA	2
1.4. JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA	3
1.5. OBJETIVOS.....	3
1.5.1. Objetivo general	3
1.5.2. Objetivos específicos.....	3
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. MARCO FILOSÓFICO O EPISTEMOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
2.2. ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN	5
2.3. BASES TEÓRICAS.....	7
2.3.1. <i>Salmonella</i>	7
2.3.1.1. Factores de virulencia	10
a) Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i> (SPI)	14
b) Sistema de Secreción de Tipo 3 (SST3)	15
c) Fimbrias y flagelos.....	18
d) Polisacáridos y otros factores de virulencia.....	18
2.3.2. Lactoferrina	19
2.3.2.1. Características generales	19
2.3.2.2. Estructura de la lactoferrina	19
2.3.2.3. Funciones biológicas de la lactoferrina	21
2.3.2.4. Actividad antibacteriana	22
III. METODOLOGÍA.....	28
3.1. TIPO DE ESTUDIO	28
3.2. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO.....	28
3.1.1. Bacteria y condiciones de cultivo.....	28
3.1.2. Lactoferrina	28

3.1.3. Hierro.....	28
3.1.4. Ensayo de la curva de crecimiento.....	29
3.3. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	30
3.4. ENSAYO DE ADHERENCIA E INVASIÓN EN CÉLULAS HEP-2	30
a) Preparación de las células HEp-2	30
b) Preparación de la suspensión bacteriana	31
c) Infección	31
3.4.1. Ensayo de Adherencia	32
3.4.1.1. Cuantificación de la adherencia	32
3.4.2. Ensayo de Invasión	33
3.4.2.1. Cuantificación de la invasión.....	33
3.4.2.2. Análisis estadístico	34
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1. RESULTADOS	36
4.1.1. Curva de Crecimiento de <i>Salmonella</i>	36
4.1.2. Ensayo de Citotoxicidad	39
4.1.3. Ensayo de Adherencia	40
4.1.4. Ensayo de Invasión	42
4.2. DISCUSIÓN.....	46
V. CONCLUSIONES.....	51
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
VII. ANEXOS	64
ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA	64
ANEXO 2: CULTIVO DE CÉLULAS EVALUADAS CON EL ENSAYO DE LA CAPTACIÓN DE ROJO NEUTRO.	66

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1: Funciones y localización de los principales determinantes de virulencia de <i>Salmonella typhimurium</i>	10
Tabla N° 2: Tratamientos para la obtención de la curva de crecimiento de las cepas SL1344 y SL1344 Δ hilA::Kan ^r	29
Tabla N° 3: Tratamientos en la adhesión/invasión a células HEp-2	32
Tabla N° 4: Correspondencia de OD ₍₆₀₀₎ con UFC/mL de SL1344 y SL1344 Δ hilA::Kan ^r	37
Tabla N° 5: Resultados del ensayo de citotoxicidad	39

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1: Causas de mortalidad en menores de 5 años en el Perú.	6
Figura N° 2: <i>Salmonella typhimurium</i>	7
Figura N° 3: Modelo de patogénesis de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	9
Figura N° 4: Representación esquemática de los genes transportados dentro de las cinco SPI y sus funciones	15
Figura N° 5: Representación esquemática del complejo aguja y sus componentes de <i>Salmonella</i>	17
Figura N° 6: Complejo aguja de <i>Salmonella typhimurium</i>	17
Figura N° 7: Diagrama esquemático de la molécula de lactoferrina bovina..	21
Figura N° 8: Posibles funciones de Lf	22
Figura N° 9: Mecanismo de acción antibacteriana de la lactoferrina (Lf)....	24
Figura N° 10: Comparación de la histopatología de ratones infectados con <i>Salmonella</i> ser. Typhimurium tratados con Lfb y sin Lfb	26
Figura N° 11: Monocapa de células HEp-2	31
Figura N° 12: Flujograma del Ensayo de Adherencia & Invasión	35
Figura N° 13: Curva de crecimiento de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium (SL1344 y SL1344 Δ hilA::Kan ^r)	36
Figura N° 14: Curva de crecimiento de la cepa de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium SL1344	38

Figura N° 15: Curva de crecimiento de la cepa (mutante) de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium SL1344 Δ hilA::Kan ^r	38
Figura N° 16: Patrones de citotoxicidad de la gentamicina sobre las células HEp2	40
Figura N° 17: Adherencia de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium SL1344 Δ hilA::Kan ^r a células HEp-2	41
Figura N° 18: Efecto de Lfb en la adherencia de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium SL1344 Δ hilA::Kan ^r	42
Figura N° 19: Efecto de Lfb en la invasión de <i>Salmonella</i> en el tratamiento pre-infección	43
Figura N° 20: Efecto de Lfb en la invasión de <i>Salmonella</i> en el tratamiento paralelo	44
Figura N° 21: Efecto de Lfb en la invasión de <i>Salmonella</i> en el tratamiento post-infección	45
Figura N° 22: Efecto de Lfb en la invasión de <i>Salmonella</i>	46

ABREVIATURAS

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco (“*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*”)

KDa: Kilodalton

Lf : Lactoferrina

Lfb: Lactoferrina bovina

Lfh: Lactoferrina humana

LPS: Lipopolisacárido

LT: Ácido lipoteicoico

MC: Medio completo (DMEM suplementado con 10% SBF y antibiótico – antimicótico)

mg: Miligramo

mL: Mililitro

OD: Densidad óptica (“*Optical density*”)

PBS: Buffer fosfato salino (“*Phosphate buffered saline*”)

SBF: Suero bovino fetal

SCV: Vacuola que contiene *Salmonella* (“*Salmonella-containing vacuole*”)

SPI: Isla de patogenicidad de *Salmonella* (“*Salmonella Pathogenicity Island*”)

SST3: Sistema de secreción de Tipo 3

UFC: Unidad formadora de colonia

μL: Microlitro

RESUMEN

La lactoferrina es una de las proteínas más importantes presentes en la leche de mamíferos, tiene efecto antimicrobiano sobre enteropatógenos, entre los cuales se encuentra *Salmonella*, la cual invade a las células intestinales epiteliales produciendo diarrea en seres humanos y animales. El objetivo principal del estudio fue evaluar el efecto de la lactoferrina bovina (Lfb) en la invasión de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium cepa SL1344 a células HEp-2. La monocapa de células HEp-2 fueron infectadas con 10^6 UFC de *Salmonella* en ausencia (control) y presencia de 1 y 10 mg /mL de Lfb (saturada con hierro) y se incubaron 1,5 horas a 37 °C. Fueron evaluados 3 tratamientos: Pre-infección (las células HEp-2 se incubaron 1 hora con Lfb y luego se infectaron a las células con *Salmonella*. La infección se realizó sin la eliminación de Lfb ni lavado de las células antes de la adición de la bacteria), paralelo (Lfb y *Salmonella* se agregaron al mismo tiempo a las células HEp-2) y post-infección (Lfb se adicionó 15 minutos después de la infección bacteriana). La capacidad de invasión de *Salmonella* se determinó mediante la cuantificación de las UFC recuperadas desde el interior de las células HEp-2 (después del tratamiento con gentamicina y triton X). El tratamiento pre-infección, mostró que la invasión de *Salmonella* a células HEp-2, disminuyó 23 % con Lfb 1 mg/mL (28×10^4 vs 21×10^4 , $p=0.04$) y 50 % con Lfb 10 mg/mL (28×10^4 vs 14×10^4 , $p=0.04$). En el tratamiento paralelo, la invasión disminuyó 49 % con Lfb 1 mg/mL (21×10^4 vs 10×10^4 , $p=0.04$) y el 91 % con Lfb 10 mg/mL (21×10^4 vs $1,9 \times 10^4$, $p=0.03$). A diferencia de los casos anteriores, Lfb no afectó la invasividad de *Salmonella* en el tratamiento post-infección. Nuestros datos indican que Lfb reduce la invasión de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium a células HEp-2. Se observó mayor disminución en la invasión de *Salmonella* en la concentración de 10 mg/mL en los tratamientos de pre-infección y paralelo.

Palabras clave: *Salmonella*; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium; lactoferrina; lactoferrina bovina; invasión.

ABSTRACT

Lactoferrin, one of the most important proteins in mammalian milk, has antimicrobial effect on enteropathogens. Among these pathogens, *Salmonella* produce diarrhea in humans and humans because invade epithelial intestinal cells. The main objective of this study was to determine the effect of bovine lactoferrin (bLf) on invasion of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium strain SL 1344 to HEp-2 cells. HEp-2 monolayers were infected with 10^6 colony forming unit (CFU) of bacteria in the absence and presence of 1 and 10 mg/mL of bLf (iron-saturated) and incubated 1.5 hours at 37°C. Three treatments were evaluated: pre-infection (HEp-2 cells were incubated with bLf 1 hour prior to the bacterial infection); parallel (bLf and the bacteria added at the same time); and post-infection (bLf was added 15 minutes after the infection). Invasiveness of *Salmonella* was determined by quantifying the CFU recovered from inside the HEp-2 cells (after treatment with 100 µg/mL and 10 µg/mL of gentamicin and Triton X -100). The pre infection treatment showed that *Salmonella* invasion decreased 23 % with bLf at 1 mg/mL (28×10^4 CFU/mL vs 21×10^4 CFU/mL, $p=0.04$) and 50 % with bLf at 10 mg/mL (28×10^4 CFU/mL vs 14×10^4 CFU/mL, $p=0.04$). In the parallel treatment, the invasion decreased 49 % with bLf at 1 mg/mL (21×10^4 CFU/mL vs 10×10^4 CFU/mL, $p=0.04$) and 91 % with bLf at 10 mg/mL (21×10^4 CFU/mL vs $1,9 \times 10^4$ CFU/mL, $p=0.03$). However, bLf does not affect the invasiveness of *Salmonella* in post – infection treatment. Our results demonstrated that bLf reduces the invasion of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium to HEp-2 cells. We observed further decreased on the invasion of *Salmonella* in the concentration of 10 mg/mL in pre-infection and parallel treatments

Key words: *Salmonella*; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium; lactoferrin; bovine lactoferrin; invasion.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

La diarrea es uno de los problemas más importantes en países en vías de desarrollo, asimismo es una de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años (Bryce, Boschi-Pinto, Shibuya, Black, & WHO Child Health Epidemiology Reference Group, 2005). Episodios múltiples de diarrea aguda y persistente afectan seriamente el crecimiento, estado nutricional y cognitivo de los niños (Guerrant et al., 1999; Lima et al., 2000). Las especies de *Salmonella* son importantes agentes causales de diarrea. La diarrea causada por *Salmonella typhimurium* ocurre en dos principales pasos. Primero, el patógeno se adhiere a los enterocitos y coloniza la membrana mucosa intestinal. Esta habilidad es mediada por estructuras de superficie, las que son codificadas en el cromosoma (por ejemplo la fimbria tipo 1, fimbria polar larga y fimbria agregativa) o plásmidos (fimbria codificada por plásmido) (Humphries et al., 2001). Una vez colonizado, la célula huésped es invadida. Takeuchi (1967) mostró por primera vez el mecanismo por el cual *S. typhimurium* penetraba a los enterocitos, incluyendo el rearrreglo del citoesqueleto de actina, formando la típica membrana “ruffling” (Hueck, 1998).

La lactoferrina (Lf) es la segunda proteína más abundante en la leche materna, y es considerada como un componente del sistema inmune innato. Además de la actividad antimicrobiana y la inhibición de la adhesión de los patógenos a los epitelios del hospedero, en algunos modelos biológicos en animales se ha encontrado que Lf estimula, modula y regula la respuesta inmune (León-Sicairos & Picos, 2010).

1.2. Formulación del problema

1.2.1 Problema general

- ¿Cómo determinar el efecto de la lactoferrina bovina en la invasión de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 a células HEp-2?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Cómo determinar el efecto de la lactoferrina bovina en la cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 y SL 1344 Δ hilA?
2. ¿Cómo evaluar el efecto citotóxico del tratamiento con gentamicina a células HEP-2?
3. ¿Cómo determinar el efecto *in vitro* de la lactoferrina sobre la adhesión de *Salmonella typhimurium* SL 1344 Δ hilA a células HEP-2?
4. ¿Cómo determinar el efecto *in vitro* de la lactoferrina en la invasividad de *Salmonella typhimurium* SL 1344?
5. ¿Cómo determinar el tratamiento y concentración de lactoferrina que permita mayor disminución de la adherencia e invasión a las células HEP-2?

1.3. Justificación teórica

La lactoferrina (Lf) es el principal agente antimicrobiano presente en la leche humana y desempeña un papel significativo en los efectos protectores de la lactancia materna (González-Chávez, Arévalo-Gallegos, & Rascón-Cruz, 2009; León-Sicairos & Picos, 2010; Theresa J. Ochoa & Cleary, 2009). Se han diseñado múltiples intervenciones para reducir la mortalidad neonatal, siendo la lactancia materna la más efectiva para la protección contra diarrea y otras causas de mortalidad (Jones et al., 2003). Se ha demostrado que la leche materna es beneficiosa en los infantes, originando menores tasas de infección y mejor desarrollo cognitivo (Anatolitou, 2012).

Diversos estudios han demostrado un efecto protector de Lf contra diferentes infecciones por enteropatógenos (Theresa J. Ochoa & Cleary, 2009). Se han propuesto múltiples mecanismos para explicar el efecto de la Lf en enteropatógenos. Se conoce que la Lf tiene actividad bacteriostática al secuestrar hierro, el cual es esencial para el crecimiento

bacteriano; además Lf puede adherirse al lípido A del lipopolisacárido bacteriano (LPS), cambiando su rigidez y consecuentemente desestabilizándolo (Appelmek et al., 1994; Brandenburg, Jürgens, Müller, Fukuoka, & Koch, 2001; Ellison, Giehl, & LaForce, 1988).

1.4. Justificación práctica

Ochoa et al. (2007) (T.J. Ochoa et al., 2007) llevaron a cabo un ensayo en el que evaluaron el efecto de la lactoferrina bovina en el crecimiento y adherencia de *S. typhimurium*. Este estudio demostró el efecto bacteriostático dependiente de hierro de la Lfb sobre *Salmonella*; así como también reportó que en condiciones no bacteriostáticas la lactoferrina disminuye la adherencia de las bacterias a las células HEP-2. Un punto importante de resaltar en este estudio es que no se analizó el efecto de lactoferrina en la invasión de células HEP-2, además que el grado de adherencia se midió de manera cualitativa, ya que las bacterias adheridas a las células HEP-2 fueron “cuantificadas de 1+ a 4+” y este método resulta ser subjetivo.

Debido a que la invasión es uno de los principales pasos en el proceso de infección de *Salmonella*, en este trabajo cuantificamos (UFC/mL) el efecto de la lactoferrina en la invasividad.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

- Determinar el efecto de la lactoferrina bovina en la invasión de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 a células HEP-2.

1.5.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la lactoferrina en la cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 Δ hila.
2. Evaluar el efecto citotóxico del tratamiento con gentamicina a células HEP-2.

3. Determinar el efecto *in vitro* de la lactoferrina sobre la adhesión de *Salmonella typhimurium* SL 1344 Δ hilA a células HEP-2.
4. Determinar el efecto *in vitro* de la lactoferrina en la invasividad de *Salmonella typhimurium* SL 1344.
5. Determinar el tratamiento y concentración de lactoferrina que permita mayor disminución de la adherencia e invasión a las células HEP-2.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

Las ciencias de la salud se caracteriza por las interfaces entre las ciencias naturales y sociales, así como también por el mantenimiento y reproducción de una tradición discursiva y práctica que se pretende y legitima como la aplicación de conocimiento científico en el manejo de la enfermedad; reflexiones de orientación epistemológica pasan a hacer parte de la construcción histórica de esta área, estando presentes tanto en la salud colectiva, la llamada medicina social como una alternativa de análisis y comprensión de los conocimientos y de la práctica clínica, con gran destaque para los trabajos de Canguilhem y Foucault (Barros da Silva & Delizoicov, 2008).

Por otro lado, la importancia de los microorganismos como causantes de las enfermedades infecciosas no fue bien conocida por la comunidad científica, hasta el siglo XIX. Tradicionalmente se creía que las enfermedades eran consecuencia de fuerzas sobrenaturales (vapores venenosos o “miasmas”, un castigo divino), o del desequilibrio entre los cuatro humores del cuerpo humano (sangre, flema, bilis amarilla [cólera] y bilis negra [melancolía]) (Guerrero & Berlanga, 2006).

2.2. Antecedentes de investigación

Las enfermedades diarreicas representan un problema de salud pública en países en vías de desarrollo, siendo una de las mayores causas de muerte en niños (Black, Morris, & Bryce, 2003; Bryce et al., 2005), se le atribuye la muerte de 760 000 niños menores de 5 años y más de mil millones de episodios por año (OMS). Los episodios múltiples de diarrea en el primer año de vida pueden deteriorar el estado nutricional y causar graves secuelas. En Perú es la tercera causa de muerte en niños menores de 5 años (Figura N° 1) (Huicho, Trelles, & Gonzales, 2006), teniendo como principales agentes enteropatógenos a bacterias como *Escherichia coli* (*E.coli* enteropatógena (ECEP), *E.coli* enteroinvasiva (ECEI) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)), *Salmonella*

spp., *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Aeromonas spp.* y *Vibrios spp.*, parásitos como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium spp.*, entre otros; así como Rotavirus (Ministerio de Salud - Dirección General de Epidemiología - Gerencia de Salud Arequipa, 2014).

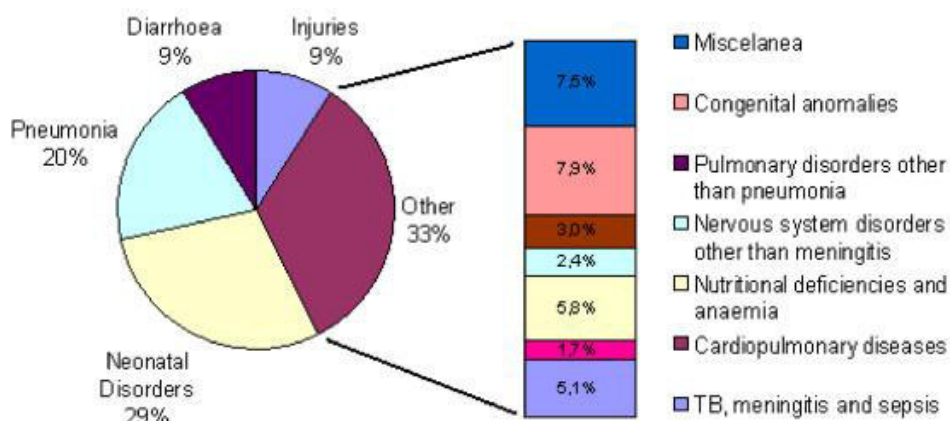


Figura N° 1: Causas de mortalidad en menores de 5 años en el Perú.

(Fuente: Huicho y col., 2006)

La lactoferrina puede contribuir a la defensa contra la invasión de bacterias intracelulares facultativas mediante la unión de glicoaminoglicanos de la membrana celular e invasinas bacterianas, previniendo de esta manera la adhesión a las células. Esta habilidad fue reportada por primera vez contra *E. coli* HB 101 y posteriormente en otras bacterias (Adlerova, Bartoskova, & Faldyna, 2008). Se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* que han demostrado un efecto protector de la lactoferrina humana (Lfh) así como la Lfb contra diferentes infecciones por enteropatógenos, las cuales incluyen: *Shigella flexneri* (Henry F. Gomez, Ochoa, Herrera-Insua, Carlin, & Cleary, 2002), *Salmonella* ser. Typhimurium (Mosquito, Ochoa, Cok, & Cleary, 2010; A. S. Naidu & Arnold, 1994; T.J. Ochoa, Cabello, Nakamatsu, & Cleary, 2007), *E. coli* enteropatógena (EPEC) (Henry F. Gomez, Ochoa, Carlin,

& Cleary, 2003), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Theresa J. Ochoa et al., 2006), *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) (T. Ochoa & Cleary, 2005) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (de Oliveira, de Araújo, Bao, & Giugliano, 2001; Giugliano, Ribeiro, Vainstein, & Ulhoa, 1995; S. S. Naidu et al., 1991).

2.3. Bases teóricas

2.3.1. *Salmonella*

Entre los enteropatógenos, *Salmonella* es uno de los más frecuentes. El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram (-), no esporulados, con flagelos peritricos, fimbrias y pilis (Figura N° 2). Algunos forman una delgada microcápsula y no producen esporas. Pueden ser aerobios o anaerobios facultativos, fermentan glucosa, maltosa y manitol, pero no metabolizan lactosa ni sacarosa. Los antígenos O (somático), Vi (capsular) y H (flagelar) son los 3 principales antígenos que determinan el serotipo de *Salmonella*. Son viables en diferentes condiciones ambientales (Cabello, 2007). *Salmonella* es mesófila, sin embargo algunas cepas pueden sobrevivir temperaturas de 2°C a 54°C. Además es capaz de producir biofilms mediante la formación de una matriz de exopolisacárido así como sobrevivir y adaptarse al pH ácido del estómago (Andino & Hanning, 2015).

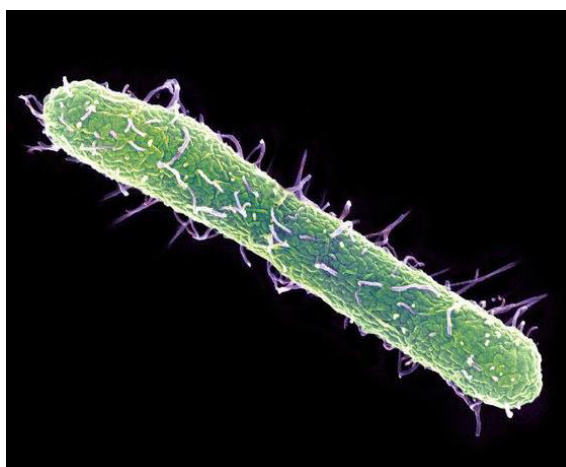


Figura N° 2: *Salmonella typhimurium*. Fotografía obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM).

(Fuente: <http://fineartamerica.com/featured/salmonella-typhimurium-bacterium-sem-.html>)

El género *Salmonella* está conformado por 2 especies distintas: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, esta última se subdivide en seis subespecies. Estas subespecies se clasifican en más de 50 serogrupos basados en el antígeno O (somático), y más de 2,400 serovares con respecto al antígeno H (flagelar) (de Jong, Parry, van der Poll, & Wiersinga, 2012). La especie *S. enterica* agrupa patógenos que son adquiridos por ingestión y puede causar diferentes síndromes como por ejemplo fiebre entérica (tifoidea), enterocolitis/diarrea, bacteremia o en algunos casos ser portador asintomático. La manifestación de la enfermedad depende de la susceptibilidad del huésped y el serovar causante de la infección (Coburn, Grassl, & Finlay, 2007). Se ha estimado que anualmente se reportan más de 27 millones de muertes causadas por la fiebre tifoidea (Crump & Mintz, 2010). El modelo de patogénesis de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) (Figura N° 3) conlleva el ingreso de la bacteria al intestino delgado, la capa de moco intestinal y la adhesión a las células epiteliales intestinales. Poco después de la adhesión, invade la célula como consecuencia de las vías de señalización de la célula huésped, incluyendo el reordenamiento del citoesqueleto. Estas modificaciones internas alteran el borde de cepillo epitelial normal e inducen la posterior formación de vacuolas que contienen *Salmonella* (SCVs), que son vesículas grandes que “ingieren” las bacterias adherentes, además de ser el único compartimento intracelular en el que *Salmonella* sobrevive y se replica. Simultáneamente, la inducción de una respuesta secretora en el epitelio intestinal inicia el reclutamiento y trans migración de fagocitos desde el espacio submucoso hacia el lumen intestinal. Este proceso está asociado con la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleuquina - 8 (IL-8). Finalmente se reconstituye el borde epitelial del cepillo apical (Fàbrega & Vila, 2013)

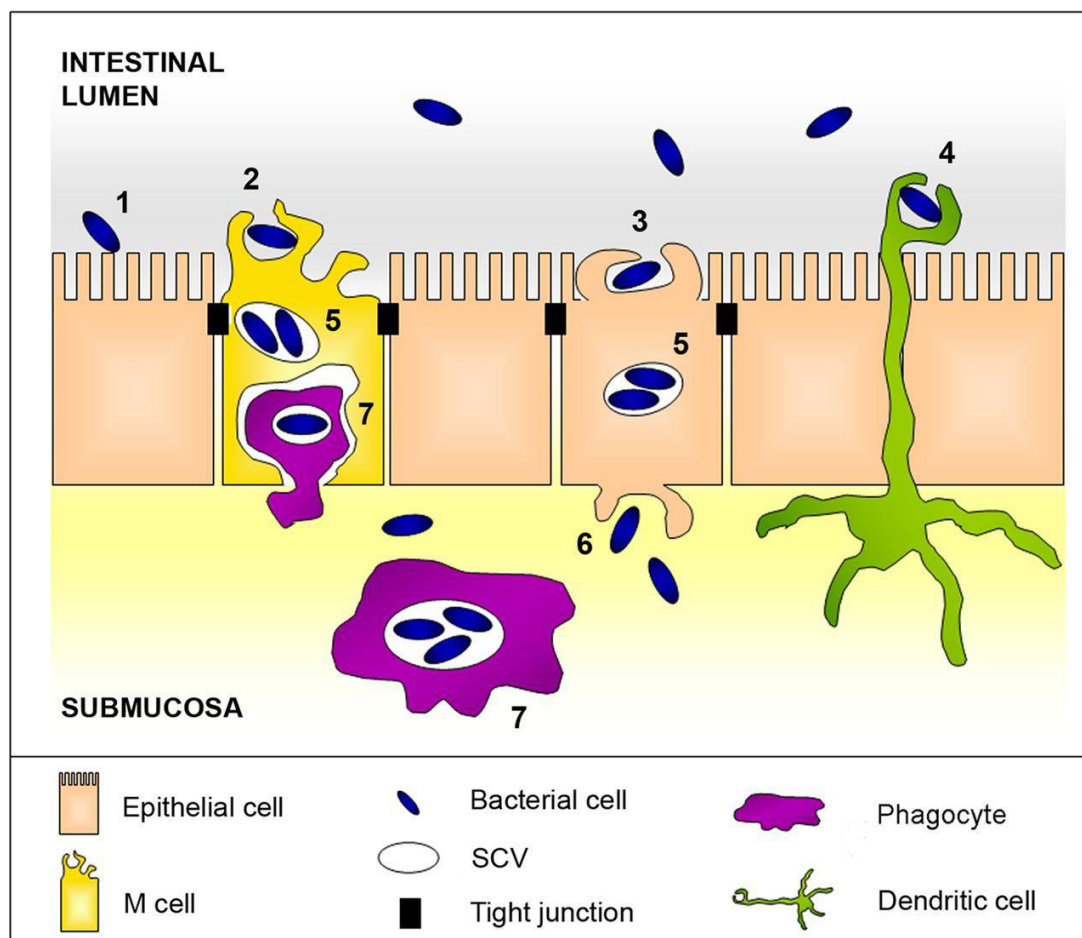


Figura N° 3: Modelo de patogénesis de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

1) *Salmonella* se une al epitelio intestinal por medio de adhesinas que son codificadas en SPI – 3 y SPI – 4. **2 y 3)** Invasión e inmersión de la bacteria mediada por factores de virulencia codificados en SPI-1 and SPI-5. **4)** Las células bacterianas pueden ser tomadas directamente por las células dendríticas de la submucosa. **5)** Una vez dentro del citoplasma, *Salmonella* se localiza dentro de la SCV, donde se replica; en esta etapa los factores codificados en SPI- 2 y el plásmido de virulencia pSLT son esenciales para la supervivencia. **6)** La SCV atraviesa la membrana basolateral y libera las células internas de la submucosa. **7)** Las bacterias son internalizadas en los fagocitos y se encuentra de nuevo dentro de una SCV, donde SPI- 3, SPI- 2 y el plásmido pSLT, juegan un papel importante. Por último, estos fagocitos infectados pueden difundir a través de la linfa y la sangre. **SPI:** Isla de patogenicidad, **SCV:** Vacuola que contienen *Salmonella*. (Fàbrega & Vila, 2013).

2.3.1.1. Factores de virulencia

Cerca del 90% de los genes de los serovares *S. typhi* y *S. typhimurium* son idénticos. El 10% de genes diferentes, incluyen factores de virulencia que determinan su potencial patogénico (Tabla N°1). Los factores de virulencia de los serovares de *Salmonella* están principalmente codificados en las islas de patogenicidad (SPI) (de Jong et al., 2012) .

Tabla N° 1: Funciones y localización de los principales determinantes de virulencia de *Salmonella typhimurium*

DETERMINANTES DE VIRULENCIA	LOCALIZACIÓN	DIANAS CONOCIDAS ^a	FUNCIÓN
<i>Flagelo</i>	Cromosoma		Acercamiento al epitelio intestinal
			Acceso eficiente a los nutrientes intestinales, a consecuencia en el intestino
		TLR5	Inducción de respuestas pro inflamatorias, inhibición de apoptosis en las células epiteliales
		IPAF	Piroptosis temprana de macrófagos
<i>Fimbria tipo I</i>	Cromosoma	Laminina	Adhesión a células epiteliales
			Formación de <i>biofilms</i>
<i>Fimbria Curli</i>	Cromosoma	Fibronectina	Adhesión a células epiteliales
<i>Fimbria Pef</i>	Plásmido pSLT	Antígeno del grupo sanguíneo Le ^x	Inducción de respuestas pro inflamatorias
			Formación de <i>biofilms</i>
			Adhesión a la criptas o glándulas de Lieberkuhn de células epiteliales

<i>Fimbria Lpf</i>	Cromosoma		Formación de <i>biofilms</i>
<i>Fimbria Std</i>	Cromosoma	Receptores $\alpha(1-2)$ Fucose	Adhesión a células epiteliales
<i>AvrA</i>	SPI-1	JNK	Inhibición de apoptosis en células epiteliales, inhibición de piroptosis de macrófagos
<i>BapA</i>	Cromosoma		Adhesión a células epiteliales, formación de <i>biofilms</i>
<i>DsbA</i>	Cromosoma		Activación de T3SS-1
		SsaC*	Activación de T3SS-2
<i>lacP</i>	SPI-1	SigD*, SopD*, SopA*	Modificación post traduccional
<i>InvB</i>	SPI-1	SipA*, SopE*, SopE2*, SopA*	Chaperona
<i>MisL</i>	SPI-3	Fibronectina	Adhesión a células epiteliales
<i>MgtCB</i>	SPI-3		Supervivencia intra-macrófago
<i>PipA</i>	SPI-5		Desarrollo de la infección sistémica
<i>PipB</i>	SPI-5		Acumulación lipídica , desarrollo de la infección sistémica ^b
<i>PipB2</i>	Cromosoma	Kinesina	Acumulación de kinesina en el SCV, inhibición de la migración perinuclear de SCV
<i>SicA</i>	SPI-1	SipB*, SipC*	Chaperona
<i>SicP</i>	SPI-1	SptP*	Chaperona
<i>SigD</i>	SPI-5		Secreción de cloro, inducción de respuesta pro-inflamatoria
		RhoG	Rearreglo del citoesqueleto de actina, invasión a células epiteliales
			Inhibición del tráfico vesicular, formación y tamaño de SCV
		Akt	Inhibición de apoptosis en células epiteliales
<i>SigE</i>	SPI-5	SigD*	Chaperona
<i>SiiE</i>	SPI-4		Adhesión a células epiteliales

<i>SifA</i>	Cromosoma	SKIP	Disminución de acumulación de kinesina en el SCV, modulación del tráfico vesicular, migración perinuclear de SCV, integridad de la membrana de SCV
<i>SipA</i>	SPI-1	Actina	Estabilización y localización de los filamentos de actina durante la invasión, estabilización de VAP, localización correcta de SifA y PipB2, morfología y migración perinuclear de SCV
<i>SipB</i>	SPI-1		Adhesión a células epiteliales
			Piroptosis temprana en macrófagos
			Autofagia de macrófagos
<i>SipC</i>	SPI-1		Adhesión a células epiteliales
<i>SipD</i>	SPI-5		Adhesión a células epiteliales
<i>SlrP</i>	Cromosoma	Trx, ERdj3	Apoptosis de células epiteliales
<i>SopE</i>	Cromosoma	Cdc42, Rac-1	Rearreglo del citoesqueleto de actina, invasión de células epiteliales, inducción de respuesta proinflamatoria
			Respiración de nitrato, a consecuencia en el intestino
<i>SopE2</i>	Cromosoma	Cdc42, Rac-1	Rearreglo del citoesqueleto de actina, invasión de células epiteliales, inducción de respuesta pro inflamatoria
<i>SopD</i>	Cromosoma		Invasión de células epiteliales en cooperación con SigD
			Replicación en macrófagos
<i>SopA</i>	Cromosoma		Inducción de respuesta pro inflamatoria
<i>SptP</i>	SPI-1	Cdc42, Rac-1	Disrupción del

			citoesqueleto de actina por antagonismo de SopE, SopE2, and SigD
<i>SpvB</i>	Plásmido pSLT	Actina	Inhibición de la polimerización de actina, inhibición de la formación de VAP y SIF, apoptosis de células epiteliales, demora de la piroptosis
<i>SpvC</i>	Plásmido pSLT	ERK	Inhibición de la inflamación
<i>SsaB</i>	SPI-2	Hook3	Disrupción del aparato de Golgi lisosomas, inhibición de la fusión SCV-lisosoma
<i>SsaE</i>	SPI-2	SseB*	Chaperona
<i>SscA</i>	SPI-2	SseC*	Chaperona
<i>SscB</i>	SPI-2	SseF*	Chaperona
<i>SseA</i>	SPI-2	SseB*, SseD*	Chaperona
<i>SseF</i>	SPI-2		Migración perinuclear de SCV
			Empaquetamiento de micro túbulos, formación de SIF
<i>SseG</i>	SPI-2		Migración perinuclear de SCV
			Empaquetamiento de micro túbulos, formación de SIF
<i>SseI</i>	Cromosoma	Filamina	Remodelación de VAP
		TRIP6	Estimulación de la motilidad de macrófagos, aceleración de la propagación sistémica
<i>SseJ</i>	Cromosoma	RhoA	Formación de SIF
<i>SseL</i>	Cromosoma		Demora de la piroptosis de macrófagos
<i>SspH2</i>	Cromosoma	Filamina, profilina	Reorganización de VAP
<i>Genes ttr</i>	SPI-2		Respiración de tetrionato, a consecuencia en el intestino

(Fàbrega & Vila, 2013)

↵^a Dianas marcadas con asteriscos se refiere a las proteínas bacterianas. Particularmente en el caso de todas las chaperonas, DsbA y IacP.

↵^b Esta función se ha sugerido de acuerdo al patrón de regulación, sin embargo, no hay información clara acerca de su rol.

a) Islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI)

Las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs) son altamente conservadas entre los diferentes serotipos de *Salmonella* (Marcus, Brumell, Pfeifer, & Finlay, 2000; Schmidt & Hensel, 2004) y están definidas como grandes regiones cromosomales que codifican determinantes responsables de establecer interacciones específicas con el huésped, y son necesarias para la virulencia bacteriana. Se desconoce el origen de las SPI; sin embargo, se dice que probablemente hayan sido adquiridas por transferencia horizontal por medio de fagos o plásmidos (Marcus et al., 2000). Al igual que otras islas de patogenicidad, las SPIs tienen un bajo contenido de G + C (entre 37-47%) comparado con el resto del cromosoma bacteriano (~52%) y generalmente están insertados en los genes de ARNt. (Marcus et al., 2000; Schmidt & Hensel, 2004).

Salmonella cuenta con cinco islas de patogenicidad: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5 (Figura N° 4). La isla de patogenicidad 1 (SPI-1) se expresa cuando la bacteria se encuentra en el lumen intestinal, es principalmente requerida para la penetración bacteriana a las células epiteliales del intestino (invasión), y la iniciación de las respuestas inflamatorias en los intestinos (Coombes et al., 2005; Hapfelmeier et al., 2004). En cuanto al rol de SPI-2, es requerida para la infección sistémica y es expresada sólo después que la bacteria ha tenido acceso a la célula huésped (Galán, 2001), por lo cual está relacionado con la habilidad de promover la supervivencia y multiplicación en células fagocíticas, y constituye el reservorio principal para la diseminación de la bacteria en órganos sistémicos (Waterman & Holden, 2003). Además se ha reportado que SPI-2, 3 y 4 son necesarias para el crecimiento y supervivencia bacteriana en el huésped, manifestándose en la fase sistémica de la enfermedad. Recientemente se han identificado factores de virulencia codificados por SPI-5, los que podrían mediar la inflamación y la secreción de cloruro que caracteriza la fase entérica de la enfermedad (Marcus et al., 2000).

SPI-1 y SPI-2 juegan un papel importante en la patogenicidad de *S. enterica*, debido a que codifican para el sistema de secreción de tipo 3

(SST3), que es capaz de translocar proteínas “efectoras” al citosol de la célula huésped (Haraga, Ohlson, & Miller, 2008; Marcus et al., 2000).

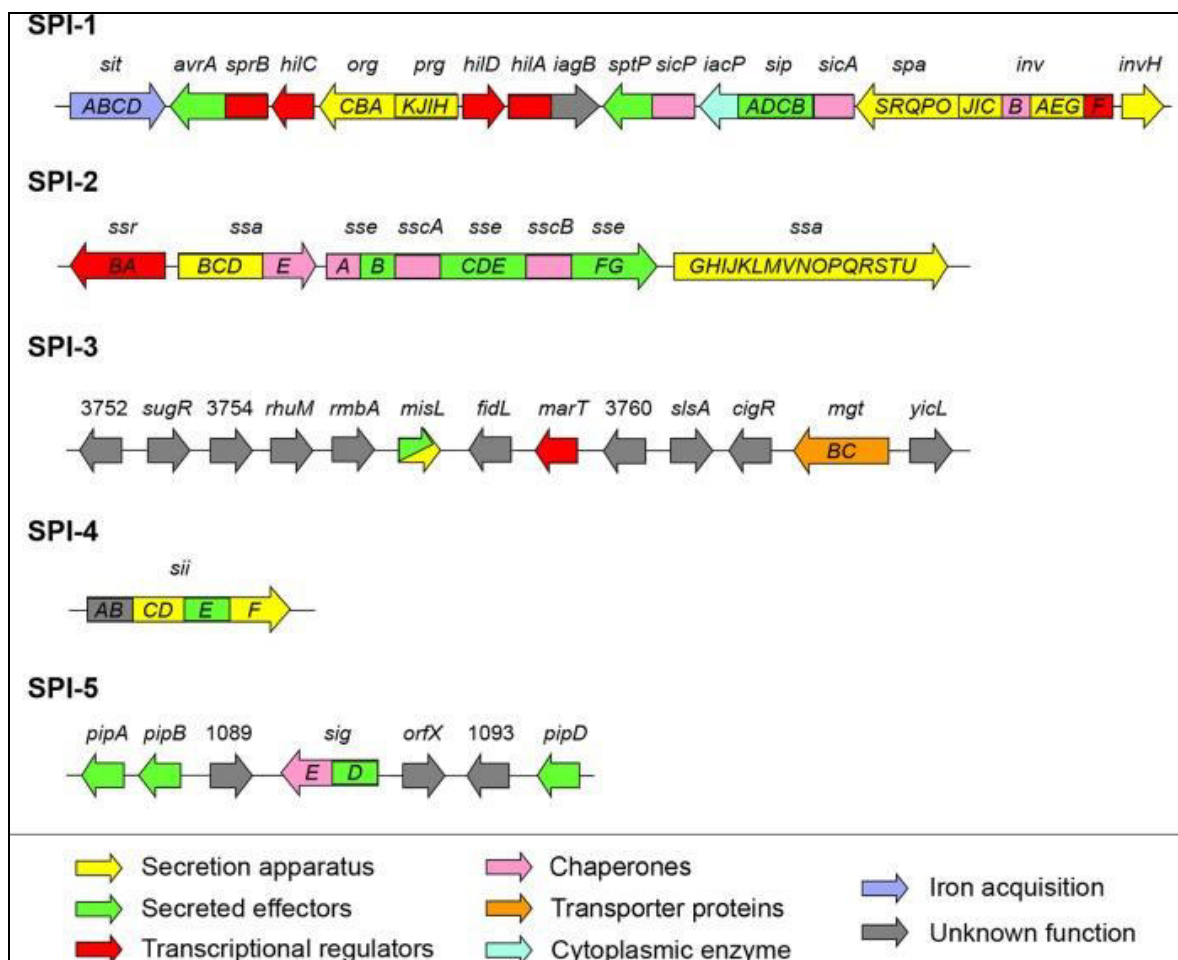


Figura N° 4: Representación esquemática de los genes transportados dentro de las cinco SPI y sus funciones. (Fàbrega & Vila, 2013)

b) Sistema de Secreción de Tipo 3 (SST3)

El SST3 está compuesto por varios componentes, que incluye más de 20 proteínas, algunas incluyen proteínas homólogas implicadas en el ensamblaje flagelar. Las proteínas efectoras generalmente requieren chaperonas específicas que impiden el plegamiento incorrecto, la degradación y asociación prematura, y puede incluso facilitar el paso del efector a las células huésped (Haraga et al., 2008; Marcus et al., 2000).

Estos sistemas están altamente regulados y las proteínas se secretan solamente cuando las bacterias reciben señales sensoriales ambientales específicas (Marcus et al., 2000).

El mecanismo por el cual se da la secreción de proteínas del SST3 no está del todo comprendido, sin embargo, se ha realizado estudios que han proporcionado información acerca de las funciones de este complejo sistema. Un subconjunto de los componentes estructurales del SST3 han mostrado tener una estructura supramolecular denominada “complejo aguja” (CA). Esta estructura se extiende entre la membrana interna y externa de la pared bacteriana; teniendo semejanza al cuerpo basal del gancho flagelar. Este complejo está compuesto por 2 pares de anillos localizados en la membrana, los que están unidos por una estructura cilíndrica hueca que sirve como base del complejo (Kubori et al., 1998). Se ha establecido que la base del complejo aguja de *Salmonella* está compuesto por 3 proteínas: InvG, PrgH y PrgK (Galán, 2001; Kubori et al., 1998). InvG, una proteína homóloga a la familia de las secretinas que forma los anillos exteriores; mientras que PrgH y PrgK forman los anillos interiores y se conectan con la estructura cilíndrica (Figura N° 5 y N° 6). (Kubori, Sukhan, Aizawa, & Galán, 2000). El ensamblaje del complejo aguja ocurre de manera escalonada y coordinada, en el que múltiples copias de las proteínas de la membrana interna y externa se organizan lateralmente como anillos en sus respectivas membranas para formar la base del CA complejo aguja (Schraidt & Marlovits, 2011), además de la coordinación de la proteína InvJ, la cual controla el tamaño de la aguja (Kubori et al., 2000).

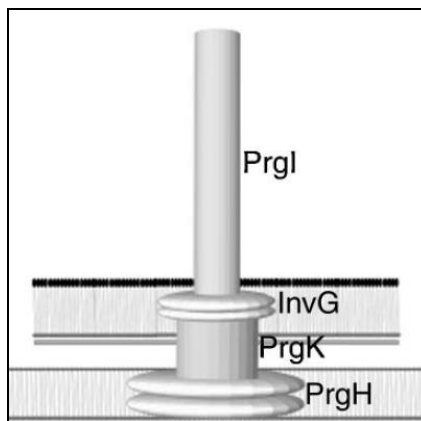


Figura N° 5: Representación esquemática del complejo aguja y sus componentes de *Salmonella*. Escala: 100 nm. (Fuente: Galán, 2001)

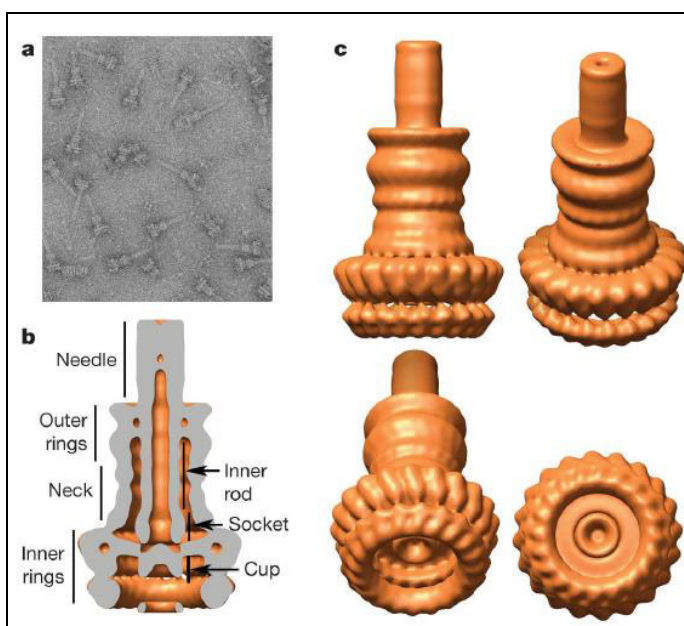


Figura N° 6: Complejo aguja de *Salmonella typhimurium*.

- a.** Complejos aguja aisladas teñidas negativamente (micrografía obtenida por microscopio electrónico). **b.** Representación de la estructura del complejo aguja que indica la ubicación de sus diferentes subestructuras. **c.** Representación de la superficie de la estructura de la aguja complejo.
(Fuente: Galán 2006)

c) Fimbrias y flagelos

Las fimbrias o pili se encuentran en la superficie bacteriana y se cree que son importantes para la adhesión inicial a las células huésped, la colonización y la formación de biopelículas, aunque se sabe poco acerca de su verdadero potencial de virulencia. Cada serovar de *Salmonella* alberga una combinación única de operones fimbriales. Los flagelos son largos filamentos helicoidales unidos a motores rotativos incorporados dentro de la membrana que permiten a las especies viajar a la barrera epitelial después de la ingestión. Los estudios *in vitro* realizados en cultivo de tejidos, han demostrado que la flagelina origina el aumento de citoquinas pro-inflamatorias (de Jong et al., 2012).

d) Polisacáridos y otros factores de virulencia

La cápsula polisacárida (antígeno Vi) es de vital importancia para la virulencia de *S. typhi*. El antígeno Vi de *Salmonella* está ausente en *S. typhimurium*, *S. paratyphi* A, y la mayoría de los serotipos. Su presencia aumenta la infectividad de *S. typhi* y la gravedad de la enfermedad, y la infección natural se asocia generalmente con la expresión de este antígeno en aislamientos de *S. typhi* (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). Sin embargo, un estudio en voluntarios humanos mostró que los mutantes negativos del antígeno Vi todavía son capaces de causar una enfermedad similar a la fiebre tifoidea (Zhang, Jeza, & Pan, 2008). Para la síntesis de Vi están involucradas dos regiones cromosómicas ampliamente separadas, *ViaA* y *ViaB*, las cuales están situados en SPI-7 (Kolyva, Waxin, & Popoff, 1992). Recientemente, se ha planteado la hipótesis de que la cápsula Vi puede prevenir el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) por el patrón de reconocimiento de receptores (PRR) en la célula huésped (Wilson et al., 2008). De esta manera *S. yphi* no provoca migración de neutrófilos en el intestino delgado por lo que es capaz de diseminarse sistémicamente y originar una infección bacteriana persistente. Otros factores de virulencia bien documentados incluyen transportadores de iones y superóxido-dismutasas (de Jong et al., 2012).

2.3.2. Lactoferrina

2.3.2.1. Características generales

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína monomérica no hémica de unión a hierro perteneciente a la familia de las transferrinas (León-Sicairos & Picos, 2010), es la segunda proteína más abundante de la leche materna. Se encuentra en una concentración de 10 mg/mL y 1 mg/mL en el calostro humano y en la leche madura, respectivamente (Theresa J. Ochoa et al., 2006). Esta proteína fue aislada por primera vez en leche bovina (Sorensen & Sorensen, 1939) y posteriormente en leche humana (Groves, 1960; Johanson, 1960; Montreuil, Tonnelat, & Mullet, 1960). Esta proteína es considerada como un componente esencial de la respuesta inmune innata, pudiéndose encontrar en lágrimas, saliva, moco intestinal y secreciones genitales. Además, tiene múltiples funciones fisiológicas, entre las cuales destacan sus actividades como inmunomoduladora, antiinflamatoria, microbioestático, microbicida de amplio espectro, antitumoral y antioxidante. Además por el hecho de contener hierro se ha postulado como una proteína de gran valor nutricional (León-Sicairos & Picos, 2010).

2.3.2.2 Estructura de la lactoferrina

Lactoferrina (Lf) es una glicoproteína de 80 KDa que presenta alta homología entre especies (Adlerova et al., 2008; González-Chávez et al., 2009; León-Sicairos & Picos, 2010; Theresa J. Ochoa & Cleary, 2009; Pierce et al., 1991). La estructura molecular y secuencia aminoacídica de la Lf humana fue descubierta en 1984 y fue clasificada como miembro de la familia de las transferrinas debido a que comparte un 60% de similitud con la transferrina sérica (Adlerova et al., 2008).

La Lf está formada por una cadena sencilla polipeptídica de aproximadamente 703 aminoácidos que se pliega en β -láminas y α -hélices dando lugar a la formación de dos lóbulos (N y C) que son altamente simétricos entre sí (33 – 42% de homología) (Adlerova et al., 2008; González-Chávez et al., 2009; León-Sicairos & Picos, 2010). El lóbulo N contiene los aminoácidos 1-332 y el lóbulo C está formado por los

aminoácidos 334 - 703; ambos lóbulos están conectados por una región bisagra que contiene α hélice entre los aminoácidos 333 y 343 en la Lf humana, lo cual le confiere flexibilidad adicional a la molécula (Adlerova et al., 2008; González-Chávez et al., 2009; León-Sicairos & Picos, 2010). A su vez, los dos lóbulos se subdividen en dos dominios N1 y N2 del extremo amino, y C1 y C2 del extremo carboxilo (León-Sicairos & Picos, 2010) (Figura N° 7).

Cada lóbulo tiene un sitio de unión de hierro (Adlerova et al., 2008; Jeremy H. Brock, 2002; Farnaud & Evans, 2003), de tal manera que, por cada molécula de Lf se pueden unir dos moléculas del ion férrico, además de un ion de carbonato (CO_3^{2-}) que se une sinérgicamente a cada ion férrico (Adlerova et al., 2008; González-Chávez et al., 2009). Los aminoácidos involucrados con el sitio de unión al ión Fe^{3+} y CO_3^{2-} en cada lóbulo son Asp, Tyr e His y Arg, respectivamente (González-Chávez et al., 2009). Se ha demostrado que Lf tiene una resistencia a la degradación proteolítica por acción de la tripsina, siendo el nivel de resistencia proporcional al grado de saturación de hierro (J. H. Brock, Arzabe, Lampreave, & Piñeiro, 1976).

Por su capacidad de unión reversible al Fe^{3+} , la Lf puede existir como holo-Lf (asociada a dos iones de Fe^{3+}) o apo-Lf (libre de Fe^{3+}) (Drago-Serrano, 2006; González-Chávez et al., 2009; León-Sicairos & Picos, 2010). Estos dos tipos de 2 moléculas tienen diferente conformación tridimensional, dependiendo de la unión con el Fe^{3+} . La conformación apo-Lf tiene la conformación abierta, mientras que holo-Lf es de conformación cerrada siendo más resistente a la proteólisis (González-Chávez et al., 2009).

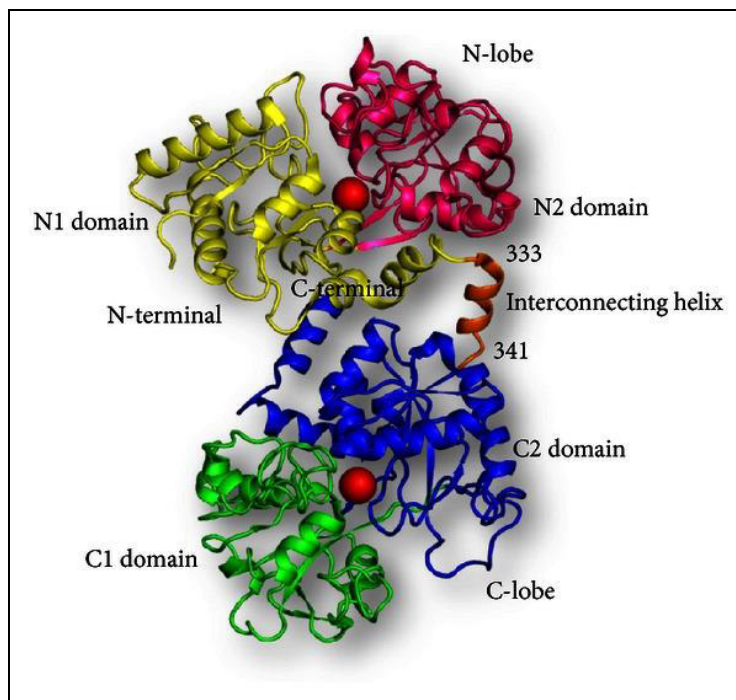


Figura N° 7: Diagrama esquemático de la molécula de lactoferrina bovina. Los dominios N1 (color amarillo) y N2 (color rosado). Los dominios C1 (color verde) y C2 (color azul). La hélice de interconexión entre los lóbulos (en color naranja). Los dos átomos de hierro se muestran como esferas de color rojo. (Sharma, Sinha, Kaushik, Kaur, & Singh, 2013)

2.3.2.3 Funciones biológicas de la lactoferrina

Esta proteína es considerada como parte del sistema inmune, participando en respuestas inmunes específicas, pero de manera indirecta. Debido a su posición estratégica en la superficie de mucosas, Lf representa uno de los primeros sistemas de defensa contra agentes microbianos que invaden los tejidos de mucosas del organismo. La lactoferrina afecta el crecimiento y proliferación de una variedad de agentes infecciosos, que incluyen bacterias Gram positivas y Gram negativas, virus, parásitos y hongos (Adlerova et al., 2008).

Debido a su similitud con la transferrina, inicialmente se le atribuyeron funciones directamente relacionadas con la habilidad de atrapar al hierro: absorción de hierro, actividad antimicrobiana, modulación del metabolismo

del hierro en los procesos inflamatorios. Ahora se conocen otras posibles funciones que parecen no estar involucradas con la capacidad del atrapar al hierro; como: inmunomodulador, antiparasítico, antifúngico, antiviral, antibacterial, proteasa, inhibidor de proteasa, ribonucleasa, procoagulante, péptido catiónico, autoanticuerpo, granulopoiesis, factor de transcripción, absorción de hierro, hipoferreaemia, antiinflamatorio, antitumoral (Jeremy H. Brock, 2002; González-Chávez et al., 2009) (Figura N° 8).



Figura N° 8: Posibles funciones de Lf. (Adaptado de Brock 2002)

2.3.2.4 Actividad antibacteriana

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado un efecto protector de la lactoferrina humana (Lf_h) así como la Lf_b contra diferentes infecciones por enteropatógenos, que incluyen bacterias Gram (+) y Gram (-). Es importante destacar que la Lf también actúa sobre cepas resistentes a antibióticos como *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y de *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina (Rodríguez-Franco, Vázquez-Moreno, & Ramos-Clamont Montfort, 2005).

Básicamente se han documentado dos propiedades de Lf referidas a su actividad antibacteriana: bacteriostática y bactericida. La función bacteriostática de Lf se da en su forma apo-Lf, y básicamente se debe a la capacidad que tiene de tomar el ion Fe³⁺, limitando a la bacteria el uso de

este nutriente en el sitio de infección e inhibiendo el crecimiento bacteriano (Drago-Serrano, 2006; Ellison et al., 1988; González-Chávez et al., 2009), así como la expresión de sus factores de crecimiento (González-Chávez et al., 2009). Sin embargo, algunas bacterias patógenas han desarrollado mecanismos para evadir el “secuestro” de hierro por Lf y que además la aprovechan como fuente de hierro. Esto último puede ser removido directamente de la Lf por receptores expresados en la superficie de ciertas bacterias patógenas Gram positivas y negativas. Otras bacterias patógenas captan el hierro en forma indirecta mediante la secreción de sideróforos capaces de remover el Fe^{3+} de la Lf; el complejo Fe-sideróforo formado es capturado en la superficie bacteriana por receptores (Reyes-Reyes, Manjarrez-Hernández, & Drago-Serrano, 2005; Ward, Uribe-Luna, & Conneely, 2002).

La función bactericida de Lf se ha atribuido a su interacción directa con las superficies bacterianas. Se ha demostrado que Lf causa daños a la membrana externa de bacterias Gram (-) a través de la interacción con el lípido A del lipopolisacárido (LPS) (Ellison et al., 1988) y porinas (Sallmann et al., 1999) (Figura N° 9. B). La carga positiva N-terminal de Lf impide la interacción entre LPS y los cationes bacterianos (Ca^{2+} y Mg^{2+}), causando la liberación de LPS de la pared celular, aumentando la permeabilidad de la membrana, con el subsiguiente daño de las bacterias (Ellison, LaForce, Giehl, Boose, & Dunn, 1990). La interacción de Lf y LPS potencia la acción de antibacterianos naturales, tales como la lisozima, que es secretada por la mucosa en concentraciones elevadas junto con Lf (Ellison & Giehl, 1991; González-Chávez et al., 2009). Asimismo, estimula el efecto de antibióticos al facilitar su acceso al interior de la bacteria; la unión a porinas de la Lf potencia la susceptibilidad de cepas de *Salmonella* hacia la eritromicina (A. S. Naidu & Arnold, 1994).

En el caso del efecto bactericida de Lf sobre las bacterias Gram (+), la unión de Lf con componentes de la pared celular es un requisito importante para que ejerza su efecto. La carga positiva de la Lf favorece su interacción

con estructuras aniónicas de la pared celular como es el ácido lipoteicoico (LT) y con ello potencia el efecto de agentes antimicrobianos naturales como la lisozima. La unión de la Lf con LT disminuye la carga negativa de la superficie de la pared celular, lo cual favorece el contacto de la lisozima con el peptidoglucano sobre el cual ejerce su efecto enzimático (Figura N° 9) (González-Chávez et al., 2009).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que Lf tiene la capacidad de evitar la fijación de ciertas bacterias a la célula huésped. Los mecanismos inhibidores de fijación aún se desconocen, pero se ha postulado que los glicanos oligomanosidos de Lf se unen a las adhesinas bacterianas, evitando la interacción con los receptores de la célula huésped (Drago-Serrano, 2006). Se ha reportado que el secuestro de hierro por Lf inhibe la formación de biopelículas bacterianas (Singh, Parsek, Greenberg, & Welsh, 2002).

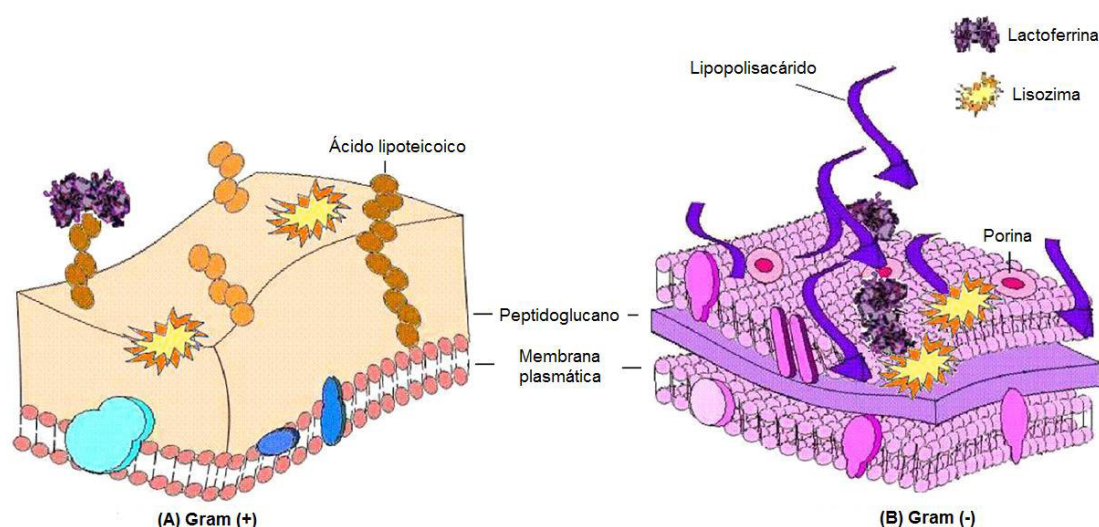


Figura N° 9: Mecanismo de acción antibacteriana de la lactoferrina (Lf).

(A) Bacterias Gram-positivas: Lf se une a moléculas cargadas negativamente de la pared celular, tales como el ácido lipoteicoico, neutralizando la carga de la pared y permitiendo la acción de otros compuestos antibacterianos como la lisozima. (B) Bacterias Gram-negativas: Lf puede unirse al lípido A del lipopolisacárido, causando la liberación de este lípido, dañando la membrana celular (Fuente: González-Chávez et al., 2009).

La lactoferrina protege a conejos de enteritis inflamatoria inducida por *Shigella flexneri* (Henry F. Gomez et al., 2002). Además se ha reportado que Lf disminuye la invasividad de *S. flexneri* en las células HeLa (H. F. Gomez et al., 2001), y bloquea la adherencia de *E. coli* enteropatógena (EPEC) (Theresa J. Ochoa et al., 2003; Theresa J. Ochoa, Noguera-Obenza, & Cleary, 2004) y de la *E. coli* productora de Shiga-toxina (STEC) a células HEp-2 (T. Ochoa & Cleary, 2005).

Mosquito et al (2010) demostraron el efecto protector *in vivo* de la Lfb en la infección de *Salmonella* ser. Typhimurium en ratones BALB/c. Dos horas antes de la infección con *Salmonella* ser. Typhimurium (300 µL de 10^7 CFU), 29 ratones recibieron Lfb (2 mg) y 29 fueron placebo (buffer). Después de la infección, los ratones recibieron Lfb (10 mg/mL) *ad libitum* o el buffer, respectivamente, durante 7 días. Se monitorearon diariamente la mortalidad, el peso y los signos clínicos (piloerección, posición inclinada y movimiento reducido). La mortalidad en el grupo control (8/29) fue mayor que en el grupo Lfb (1/29). A partir del tercer día después de la infección, el grupo control fue significativamente más sintomático ($P < 0.05$). El hemocultivo para *Salmonella* spp. fue positivo para todos los ratones estudiados en el grupo control (17/17), pero positivo sólo 6/17 animales ($P < 0.05$) en el grupo Lfb. En el grupo Lfb, los estudios patológicos mostraron menos inflamación y necrosis focal en los cuatro órganos estudiados (intestino, hígado, bazo y cerebro) (Figura N° 10), con la mayor diferencia encontrada en el intestino. Por lo que concluyeron que Lfb protege la infección contra *Salmonella* ser. Typhimurium en ratones, reduciendo la gravedad, mortalidad y el grado de inflamación de esta infección (Mosquito et al., 2010).

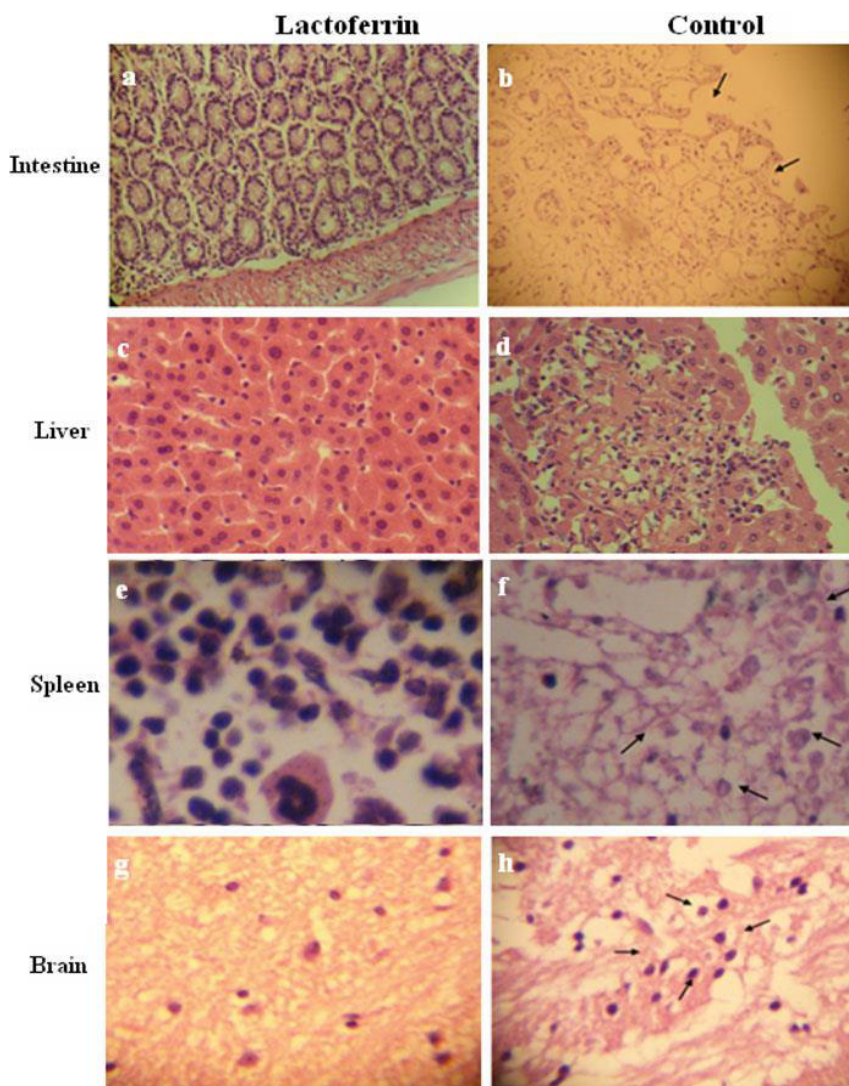


Figura N° 10: Comparación de la histopatología de ratones infectados con *Salmonella* ser. Typhimurium tratados con Lfb y sin Lfb. Después de 7 días post infección, los ratones fueron sacrificados y se evaluó intestino, hígado, bazo y cerebro. (Fuente: Mosquito et al, 2010)

Wu et al 2013 aislaron y purificaron la lactoferrina humana recombinante (rhLf) a partir de arroz transgénico y verificaron sus actividades antibacterianas en *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*. Se evaluó el efecto inhibitorio a diferentes concentraciones rhLf (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 y 5,0 mg/mL). Ellos encontraron que 5 mg/mL y 4 mg/mL de rhLf inhibió persistentemente *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, 2 mg/mL y 1 mg/mL de rhLf mostraron efectos inhibidores significativos en

el período posterior; mientras que 0,5 mg/mL o menor concentración no mostró efectos inhibitorios. En cuanto a *Bacillus cereus*, sólo 5 mg/mL y 4 mg/ml de rhLf exhibieron ciertos efectos inhibidores dentro de 18 horas. *Listeria monocytogenes* se inhibió dentro de las 18 horas sólo a 5 mg/ml de rhLf. Por lo que concluyeron que la proteína purificada tiene actividades antibacterianas significativas (Wu et al., 2013).

Wu et al 2016 investigaron el efecto *in vivo* de la lactoferrina humana recombinante (rhLf) de la leche de vacas transgénicas sobre la infección por *Salmonella enterica* serovar typhimurium en ratones. Los resultados mostraron que la rhLf disminuyó la carga bacteriana en el hígado y el bazo, redujo el grado de hepatomegalia y esplenomegalia, además atenuó la inflamación infecciosa con menos anomalías histopatológicas en el hígado, el bazo y el riñón de ratones infectados con *Salmonella*. Este estudio mostró que 6 mg de rhLf por día tenía actividad antibacteriana y podía aliviar la infección causada por *Salmonella*, lo que indicó que rhLf podría ser utilizado como un suplemento en productos especiales (Wu et al., 2016).

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de Estudio

El estudio realizado es de tipo experimental. Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Enfermedades Entéricas y Nutrición (LEEN) del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

3.2. Determinación de la curva de crecimiento

3.1.1. Bacteria y condiciones de cultivo

En este estudio fueron usadas *Salmonella enterica* ser. Typhimurium SL1344 silvestre (NCTC 13347) y *Salmonella enterica* ser. Typhimurium SL1344 $\Delta hilA::Kan^r$. Esta última cepa fue usada como control negativo de los ensayos de invasión ya que está afectada en su capacidad de translocar proteínas efectoras a través del SST3 y por consiguiente en su capacidad de invasión.

Las cepas fueron sembradas en el medio de mantenimiento Agar Peptona (g/100mL): 2 de Peptona Bacteriológica, 0.5 de NaCl y 1 de Agar-agar y conservadas a temperatura ambiente. Un día antes de cada ensayo, las cepas se cultivaron en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB), y se incubaron toda la noche a 37°C (Contreras García, 2010).

3.1.2. Lactoferrina

En todos los experimentos se utilizó lactoferrina bovina (Lfb) obtenida de Tatua Biologics (Tatua, Nueva Zelanda). La concentración de Lfb que se emplearon fueron 10 mg/mL (0.125 mmol/L) y 1 mg/mL (0.0125 mmol/L), las cuales corresponden a la concentración de Lf presente en el calostro humano y leche madura, respectivamente (Theresa J. Ochoa et al., 2006).

3.1.3. Hierro

Se preparó una solución madre de cloruro férrico de 20 mg/mL, a partir de la cual se realizaron los ensayos en una relación de 2:1 y 4:1 molar

respecto a las concentraciones de Lfb (1 mg/mL y 10 mg/mL) para evaluar las condiciones de saturación y sobresaturación con hierro, respectivamente (T.J. Ochoa et al., 2007).

3.1.4. Ensayo de la curva de crecimiento

A partir de un cultivo de 24 h de la cepa *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344, se realizó una dilución 1:50, utilizando como diluyente el medio LB. Esta dilución bacteriana se enfrentó con los tratamientos: presencia o ausencia de Lfb, saturando o no el medio con hierro (Tabla 2), los cuales fueron incubados a 37°C en agitación (200 rpm). El crecimiento bacteriano fue monitoreado durante 7 horas, midiendo la densidad óptica (OD₆₀₀) de una alícuota del cultivo (Theresa J. Ochoa et al., 2006). Adicionalmente, se realizaron 3 diluciones de cada alícuota y se sembraron en agar McConkey para el cálculo de UFC/mL.

Tabla N° 2: Tratamientos para la obtención de la curva de crecimiento de las cepas SL1344 y SL1344 Δ hilA::Kanr

Bacterias	Tratamiento
Cepa SL1344 & Cepa mutante (SL1344 ΔhilA)	Control
	Bact + Lfb (1mg/mL)
	Bact + Lfb (10mg/mL)
	Lfb (1mg/mL) + FeCl ₃ (Saturado)
	Lfb (1mg/mL) + FeCl ₃ (Sobresaturado)
	Lfb (10mg/mL) + FeCl ₃ (Saturado)
	Lfb (10mg/mL) + FeCl ₃ (Sobresaturado)

3.3. Ensayo de Citotoxicidad

Debido a que el ensayo de invasión requiere el tratamiento del cultivo celular con concentraciones de gentamicina (100 y 10 $\mu\text{g/mL}$), se llevó a cabo el ensayo de la captación de rojo neutro (Anexo N° 2) con algunas modificaciones (“Neutral red uptake assay”) (Repetto, del Peso, & Zurita, 2008) con la finalidad de corroborar que este antibiótico no dañaba el cultivo celular. Para ello, luego de conseguir una monocapa de células HEp-2 ($\sim 10^5$ cels/mL) en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, EE.UU), se agregaron 200 μL /pocillo de las concentraciones de gentamicina (10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 800 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$ y 2000 $\mu\text{g/mL}$), utilizando como diluyente medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM); además se evaluaron los medios DMEM, de adherencia y la lactoferrina (10 mg/mL) y se incubó a 37°C por 4 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de los pocillos y se adicionó 100 μL de rojo neutro a cada pocillo y se incubó por 2 horas. Luego, se lavó con PBS y se agregó la solución decolorante (50% etanol al 96%, 49 % agua desionizada y 1% ácido acético glacial). Pasados 10 minutos, se procedió a realizar la lectura a una densidad óptica de 560 (OD_{560}) en una lectora de microplacas de ELISA.

3.4. Ensayo de adherencia e invasión en células HEp-2

a) Preparación de las células HEp-2

Las células fueron cultivadas en medio DMEM con 10% de suero bovino fetal (SBF) suplementado con antibiótico – antimicótico, denominado como medio completo (MC) durante 3 días a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 . Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 – 90% (Figura N° 11), éstas fueron lavadas con solución salina tamponada de Hank’s (HBSS) y seguidamente, se agregó tripsina (1x, 0.025% EDTA) y se incubó 3 minutos (37°C / 5% CO_2). Después del periodo de incubación se agregó medio MC para inactivar la acción de la tripsina. Luego se centrifugó (1500 RPM / 10 minutos) y se colectaron las células que fueron resuspendidas en medio MC para su conteo. Luego, las células fueron colocadas en placas de

cultivo celular de 24 pozos (10^5 células/pozo) e incubadas toda la noche a 37°C en 5% CO_2 .

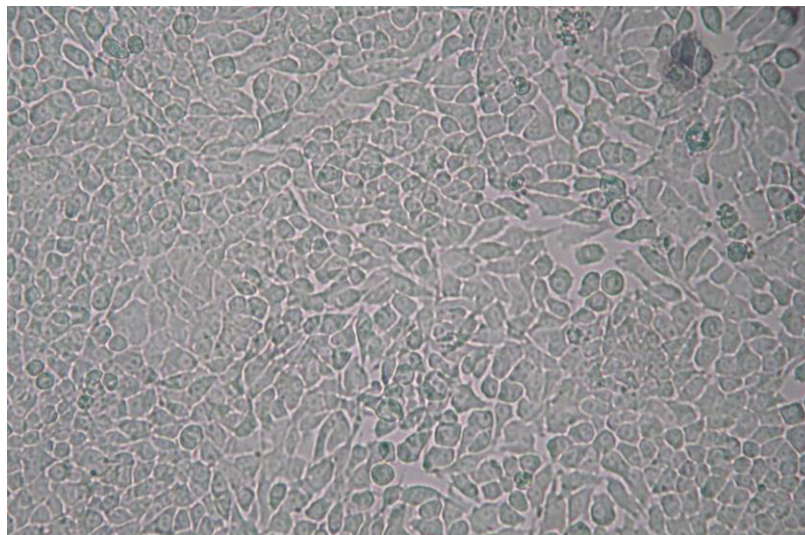


Figura N° 11: Monocapa de células HEp-2

b) Preparación de la suspensión bacteriana

Las bacterias fueron cultivadas por 24 h en 5 mL de LB y luego subcultivadas en 50 mL de medio LB fresco, el cual se incubó (37°C / 200 rpm, aproximadamente 1 hora) hasta obtener 10^6 UFC/mL. Esta suspensión bacteriana fue repartida en viales de 1 y 2 mL y fueron centrifugadas, y resuspendidas en 2 diferentes medios: en medio de adherencia (MA) (DMEM, 100 mmol HEPES/L, pH 7 con 1% de D-manosa) para el ensayo de adherencia y en medio MC para los ensayos de invasión. Dependiendo del tipo de tratamiento, se prepararon suspensiones bacterianas 1X ($\sim 10^6$ UFC/mL, el pellet de los viales de 1 mL se resuspendió en 1 mL de medio) y 2X ($\sim 2 \times 10^6$ UFC/mL, el pellet de los viales de 2 mL se resuspendió en 1 mL) (T.J. Ochoa et al., 2007).

c) Infección

Las células Hep-2 fueron lavadas. Luego se colocó 1 mL de suspensión bacteriana y 1 mL de la suspensión de Lfb (saturada con hierro) en cada pocillo (Tabla N° 3) (T.J. Ochoa et al., 2007) . Se incubó (para que se permita la infección de las células) 1.5 h. a 37°C en 5% de CO_2 .

Tanto los ensayos de adherencia como de invasión fueron evaluados en 3 diferentes tiempos de infección:

- i) Pre infección: La monocapa de células HEp-2 fueron preincubadas 1 hora con Lfb (1 y 10 mg/mL en MC), luego, sin lavar las células se agregó la suspensión bacteriana 2X a cada pocillo.
- ii) Paralelo: Lfb (1 y 10 mg/mL en MC) y suspensión bacteriana 1X ($\sim 10^6$ UFC/mL) fue agregada a las células HEp-2 al mismo tiempo.
- iii) Post infección: Las células HEp-2 fueron infectadas con la suspensión bacteriana de Salmonella 1X e incubadas por 15 minutos, luego se agregó a cada pozo la suspensión de Lfb (2 y 20 mg/mL en MC).

Tabla N° 3: Tratamientos en la adhesión/invasión a células HEp-2

Tratamiento
Suspensión bacteriana
Suspensión bacteriana + Lfb _(1 mg/mL) + FeCl ₃ (Saturado)
Suspensión bacteriana + Lfb _(10mg/mL) + FeCl ₃ (Saturado)

3.4.1. Ensayo de Adherencia

Luego de los pasos descritos en el ítem anterior, la monocapa de células HEp-2 fue lavada con medio Hanks para remover las bacterias no adheridas.

3.4.1.1. Cuantificación de la adherencia

El grado de adherencia fue evaluado por UFC/mL. Adicionalmente, se prepararon láminas para la observación en el microscopio. Luego del periodo de incubación y lavado con HBSS para desprender las bacterias no adheridas en la laminilla cubreobjetos, las células fueron fijadas con metanol al 100% durante 10 min (-20°C) y luego coloreadas con solución Giemsa al

10% durante 20 min. Para el cálculo de las UFCs/mL, las células HEp-2 fueron tratadas con Triton X-100, luego se realizaron diluciones seriadas con PBS y se sembró en placas de agar McConckey (Theresa J. Ochoa et al., 2006).

3.4.2. Ensayo de Invasión

El ensayo de invasión empleado en este estudio, se basa en el tratamiento de las células con gentamicina, ya que este antibiótico no penetra células eucariotas (Antonini et al., 1997); y al aplicarlo éste elimina a las bacterias extracelulares sin afectar a las células ni a las bacterias intracelulares. Para el ensayo de invasión, se siguió el procedimiento de Lee *et al.* (Lee, Jones, & Falkow, 1992) con algunas modificaciones. Transcurrido el periodo de infección y el paso de lavado; adicionalmente, se realizaron 2 tratamientos con gentamicina (1mL de DMEM - HEPES + 100µg /mL de gentamicina) 1 hora/37°C, seguido de 1mL de DMEM - HEPES + 10µg /mL de gentamicina 2 horas/37°C), con la finalidad de excluir la totalidad de las bacterias extracelulares.

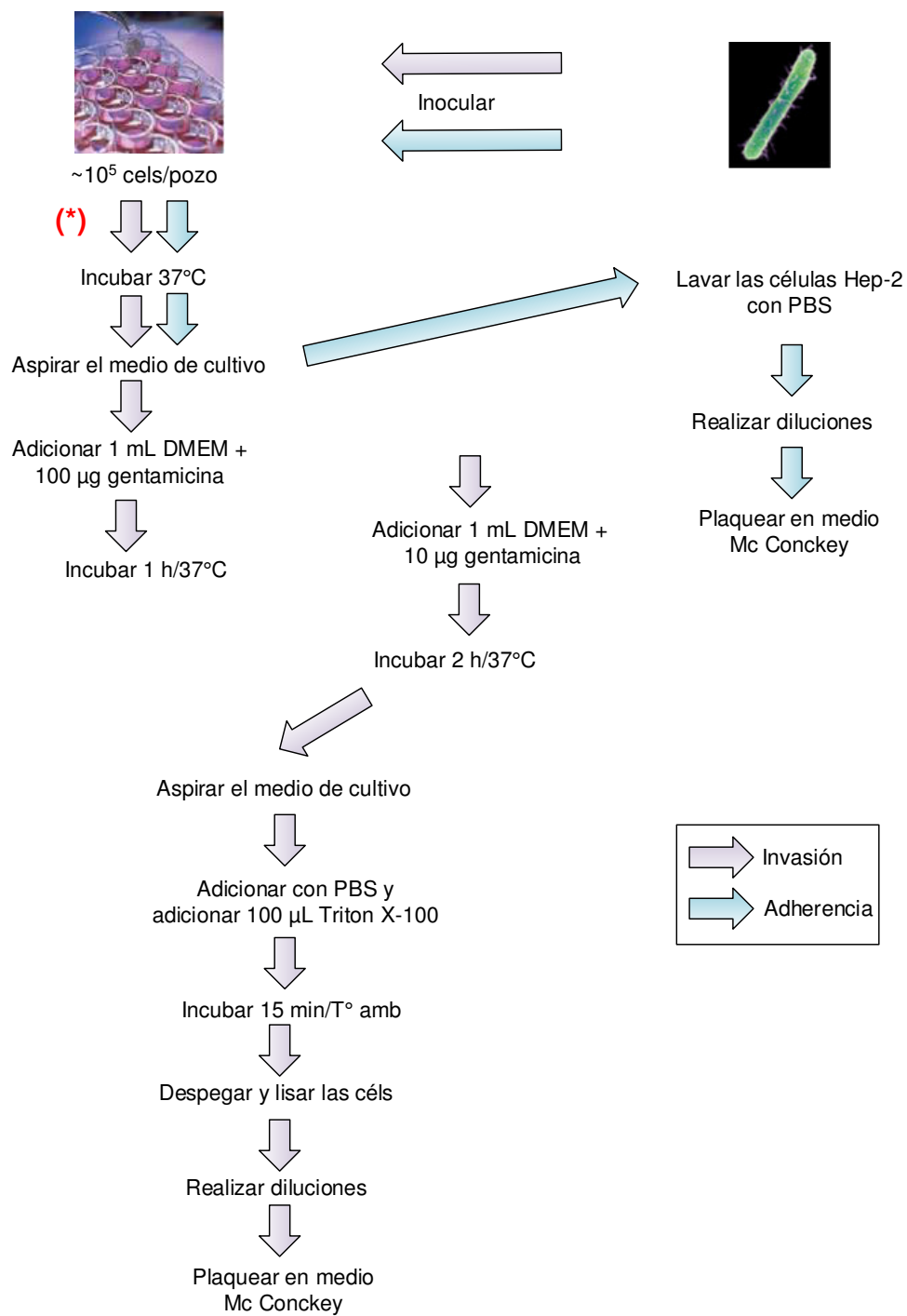
3.3.2.1. Cuantificación de la invasión

Luego del periodo de infección, incubación, tratamiento con gentamicina y lavado, se lisaron las células adicionando 100 µl de Triton X-100 al 1% en PBS y se dejó incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Enseguida, se removió el contenido de cada pozo (despegando y lisando las células para liberar las bacterias) este producto se diluyó y se sembró en agar Mac Conkey. Después del periodo de incubación, se contó el número de UFC/mL y se calculó el porcentaje de bacterias (que hayan invadido a las células) recuperadas con respecto al inóculo sembrado en cada pozo (Cardona & Sánchez, 2005).

Todos los ensayos de adherencia e invasión se hicieron en condiciones saturadas con hierro para evaluar el efecto de Lfb en las células HEp-2 en ausencia del efecto bacteriostático. Además todos los ensayos se realizaron por duplicado, los mismos que se repitieron por 3 veces.

3.3.2.2. Análisis estadístico

La comparación entre los tratamientos fueron analizados por la prueba de Mann-Whitney, el nivel de significancia fue definido como $p < 0,05$, con una probabilidad del 95%. El programa empleado fue SPSS versión 19.0 fue usado para los análisis.



(*) Depende del tiempo de infección: Pre - infección, paralelo, post – infección

Figura N° 12: Flujograma del Ensayo de Adherencia & Invasión

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Curva de Crecimiento de *Salmonella*

El análisis de la curva de crecimiento fue realizado con las 2 cepas de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (SL1344 y SL1344 Δ hilA::Kan^r). Antes de evaluar el efecto de Lfb en el crecimiento bacteriano, se analizó en comportamiento normal de las cepas; en donde se observó que ambas cepas mostraron una curva de crecimiento muy similar (Figura N° 13).

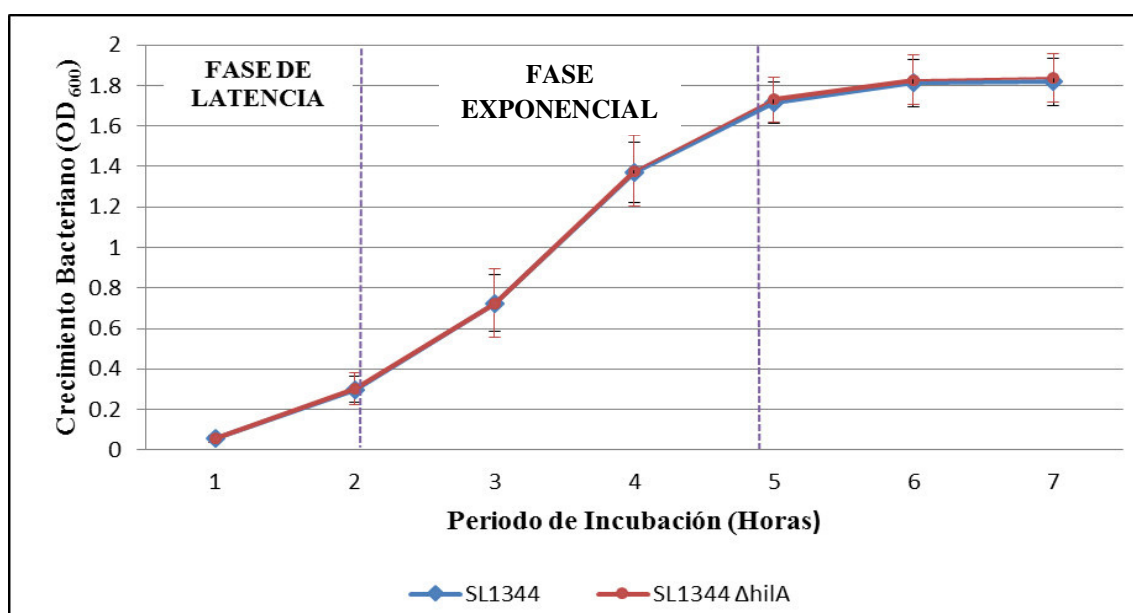


Figura N° 13: Curva de crecimiento de las cepas de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (SL1344 y SL1344 Δ hilA::Kan^r).

La curva de crecimiento está dividida en tres fases de crecimiento: Latencia (0-2 hrs), Exponencial (2-5 hrs) y Estacionaria (5-7 hrs). Cada punto corresponde a la media del dato \pm desviación estándar (SD).

Además de los resultados obtenidos por espectofotometría (OD₆₀₀) en la curva de crecimiento de *Salmonella* (Figura N° 14), se realizaron diluciones de cada alícuota y se sembraron en agar McConkey para el cálculo de UFC/mL, para establecer la correspondencia entre UFC/mL y OD₆₀₀ (Tabla N° 4).

Tabla N° 4: Correspondencia de OD₍₆₀₀₎ con UFC/mL de SL1344 y SL1344 Δ hilA::Kan^r

Tiempo de incubación (hrs)	SL 1344		SL1344 Δ hilA	
	OD ₍₆₀₀₎	UFC/mL	OD ₍₆₀₀₎	UFC/mL
1	0.055	1,01 x 10 ⁷	0.056	8,59 x 10 ⁶
2	0.298	6,31 x 10 ⁷	0.301	6,00 x 10 ⁷
3	0.725	3,76 x 10 ⁸	0.726	3,77 x 10 ⁸
4	1.369	1,73 x 10 ⁹	1.378	1,86 x 10 ⁹
5	1.713	3,95 x 10 ⁹	1.731	3,04 x 10 ⁹
6	1.813	4,61 x 10 ⁹	1.827	3,70 x 10 ⁹
7	1.819	9,20 x 10 ⁹	1.836	9,87 x 10 ⁹

Se determinó el efecto de la Lfb a la concentración de 1 y 10 mg/mL sobre el crecimiento de *Salmonella*, medido por espectrofotometría OD₍₆₀₀₎ (Figura N° 15 y 16). La Lfb inhibió el crecimiento de *Salmonella*, durante la fase logarítmica del crecimiento. En ambas cepas evaluadas la Lfb tuvo un efecto bacteriostático, el mismo que fue revertido al saturar la Lfb con hierro.

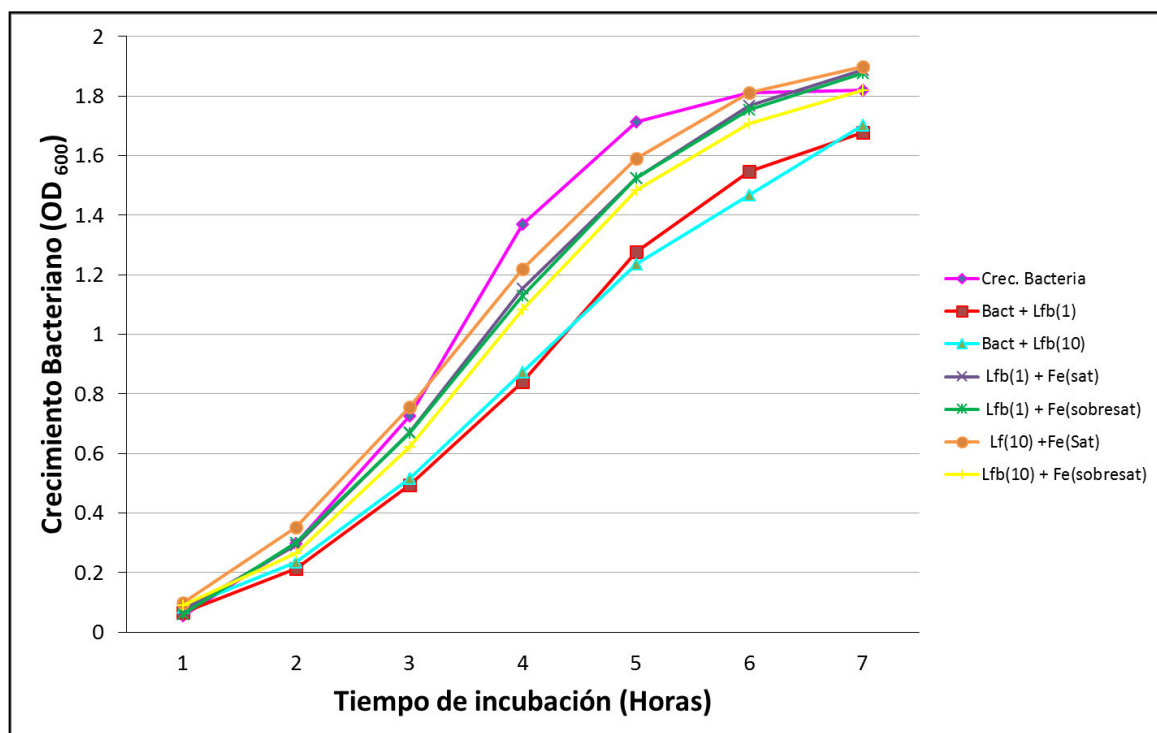


Figura N° 14: Curva de crecimiento de la cepa de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium SL1344.

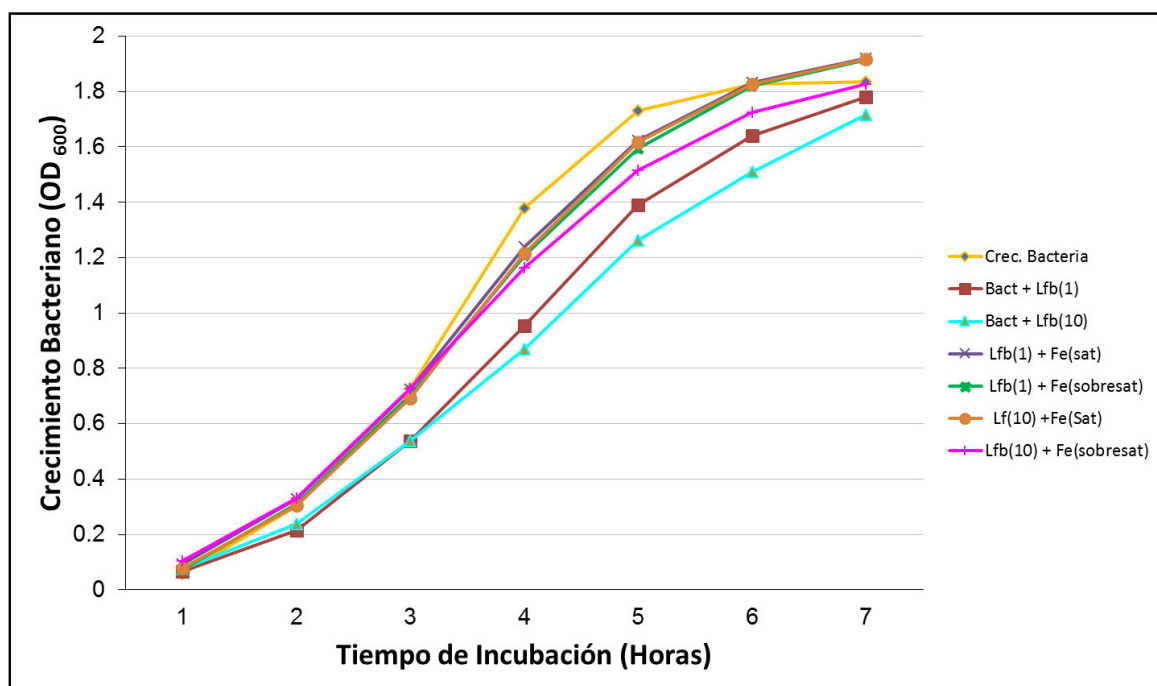


Figura N° 15: Curva de crecimiento de la cepa (mutante) de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium SL1344 Δ hilA::Kan^r

4.1.2. Ensayo de Citotoxicidad

Debido a que en el ensayo de invasión se empleó gentamicina, se evaluó la posible toxicidad de la concentración de trabajo de este antibiótico sobre las células HEp-2. Se empleó el ensayo de la captación de rojo neutro (*“Neutral red uptake assay”*); para lo cual se evaluaron las concentraciones de trabajo, así como concentraciones superiores (10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 y 2000 µg/mL), utilizando como diluyente DMEM. Además se evaluó lactoferrina (10 mg/mL).

Tabla N° 5: Resultados del ensayo de citotoxicidad

Tratamiento	OD ₅₆₀
Ctrol (DMEM)	0,289
Agua + MA	0,275
MA + gentamicina 100 µg/mL)	0,263
Gentamicina (10 µg/mL)	0,277
Gentamicina (50 µg/mL)	0,258
Gentamicina (100 µg/mL)	0,284
Gentamicina (200 µg/mL)	0,313
Gentamicina (400 µg/mL)	0,268
Gentamicina (800 µg/mL)	0,285
Gentamicina (1000 µg/mL)	0,297
Gentamicina (2000 µg/mL)	0,283
Lactoferrina (10 mg/mL)	0,292

MA: Medio de adherencia

Los resultados mostraron que no se evidenciaron cambios y/o efecto citotóxico en las concentraciones evaluadas (Tabla N° 5 y Figura N° 17); lo cual indica que las concentraciones de trabajo de la gentamicina y la lactoferrina a 10 mg/mL no son tóxicos para las células (Figura N° 17). Por otro lado, se garantiza que para el caso de los ensayos de invasión, si se presentara algún efecto en las células, se deben a la acción de la bacteria.

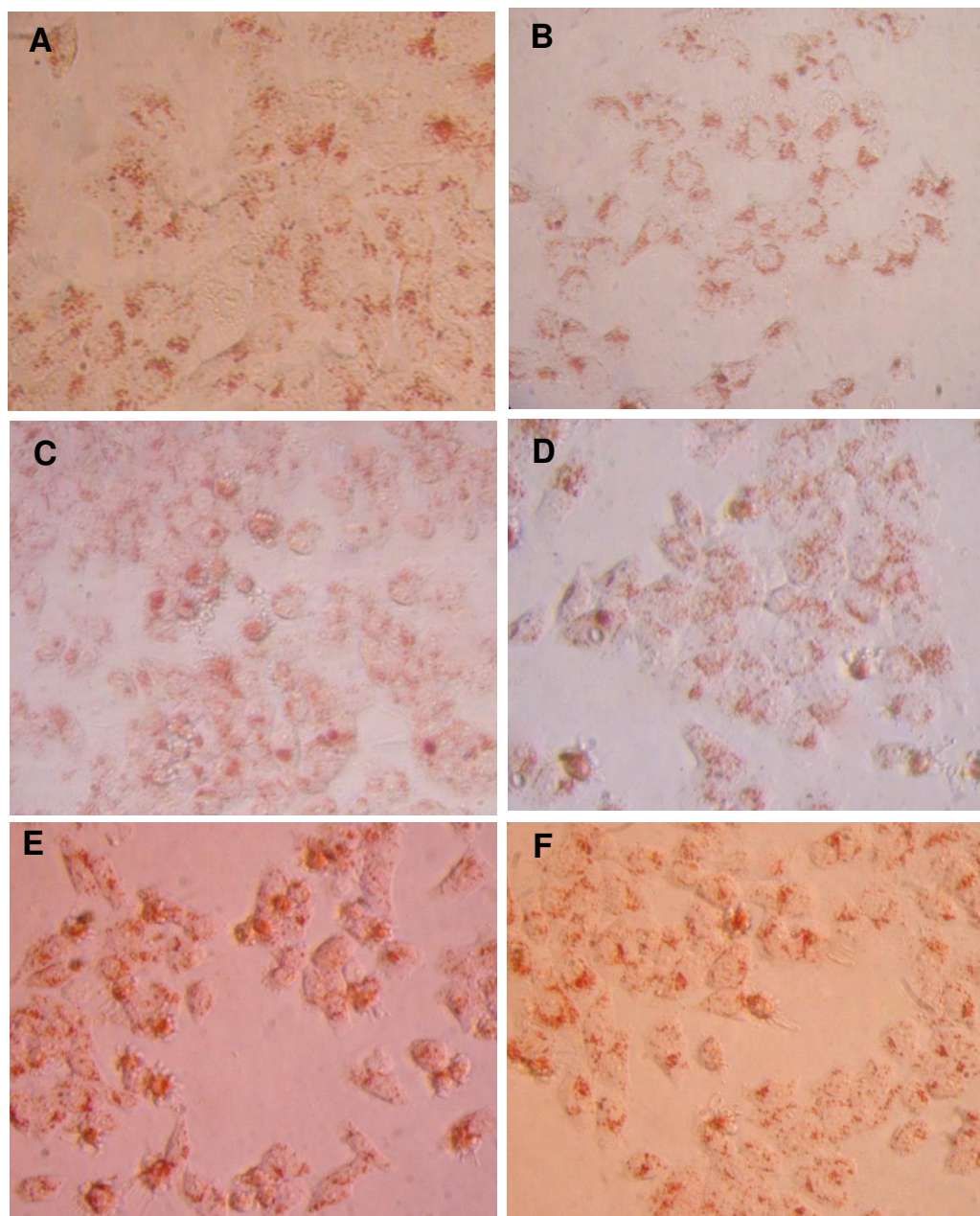


Figura N° 16: Patrones de citotoxicidad de la gentamicina sobre las células HEp2.

(A) Control (DMEM). **(B)** Agua + medio de adherencia (MA). **(C)** MA + gentamicina 100µ/mL. **(D)** Gentamicina 10 µ/mL. **(E)** Gentamicina 200 µ/mL. **(F)** Lactoferrina 10 mg/mL

4.1.3. Ensayo de Adherencia

Para la evaluación de la adherencia, se tomaron en cuenta los resultados obtenidos con la cepa *Salmonella enterica* ser. Typhimurium SL1344 Δ hilA::Kan^r debido a que ésta presenta una mutación en el gen que

regula la secreción de proteína del complejo aguja y ha perdido la capacidad de invadir células (Figura N° 18).

La adherencia de *Salmonella* a las células HEp-2 fueron evaluadas en 3 diferentes tiempos de infección: Pre infección, paralelo y post infección.

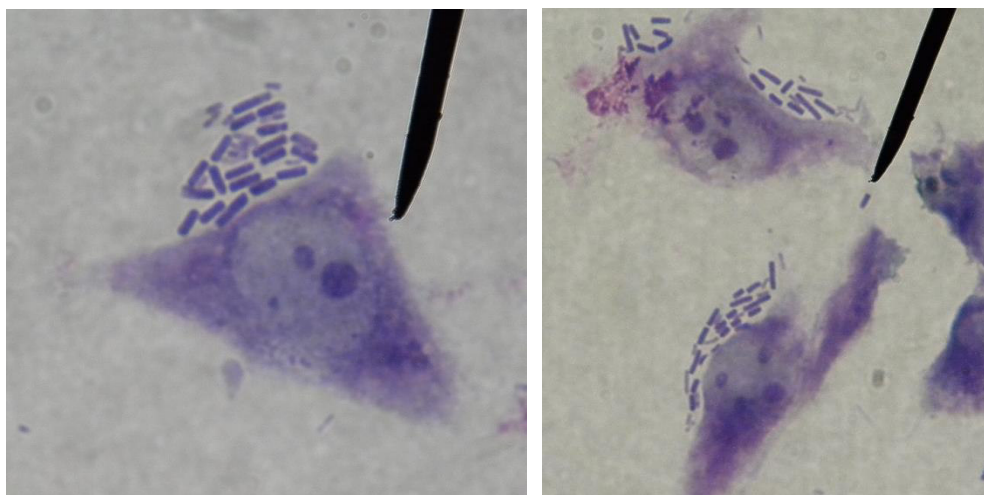


Figura N° 17: Adherencia de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium SL1344 Δ hilA::Kan^r a células HEp-2.

Pre-infección: En comparación con el control, no se observó diferencia significativa con Lfb 1 mg/mL ($1,47 \times 10^4$ UFC/mL vs $1,59 \times 10^4$ UFC/mL, $p > 0,05$); sin embargo, cuando se evaluó con Lfb 10 mg/mL, si se evidenció diferencia significativa ($1,47 \times 10^4$ UFC/mL vs $0,76 \times 10^4$ UFC/mL, $p < 0,05$) (Figura N° 19).

Paralelo: No se demostró diferencia significativa con Lfb 1 mg/mL ($1,27 \times 10^5$ UFC/mL vs $1,52 \times 10^5$ UFC/mL, $p > 0,05$), ni con Lfb 10 mg/mL ($1,27 \times 10^5$ UFC/mL vs $1,54 \times 10^5$ UFC/mL, $p > 0,05$) (Figura N° 19).

Post-infección: Se encontró diferencia significativa cuando se comparó el control con Lfb 10 mg/mL ($2,17 \times 10^5$ UFC/mL vs $0,78 \times 10^5$ UFC/mL, $p < 0,05$), sin embargo, no se encontró diferencia significativa cuando se

evaluó la concentración de Lfb 1 mg/mL ($2,17 \times 10^5$ UFC/mL vs $2,88 \times 10^5$ UFC/mL, $p > 0,05$) (Figura N° 19).

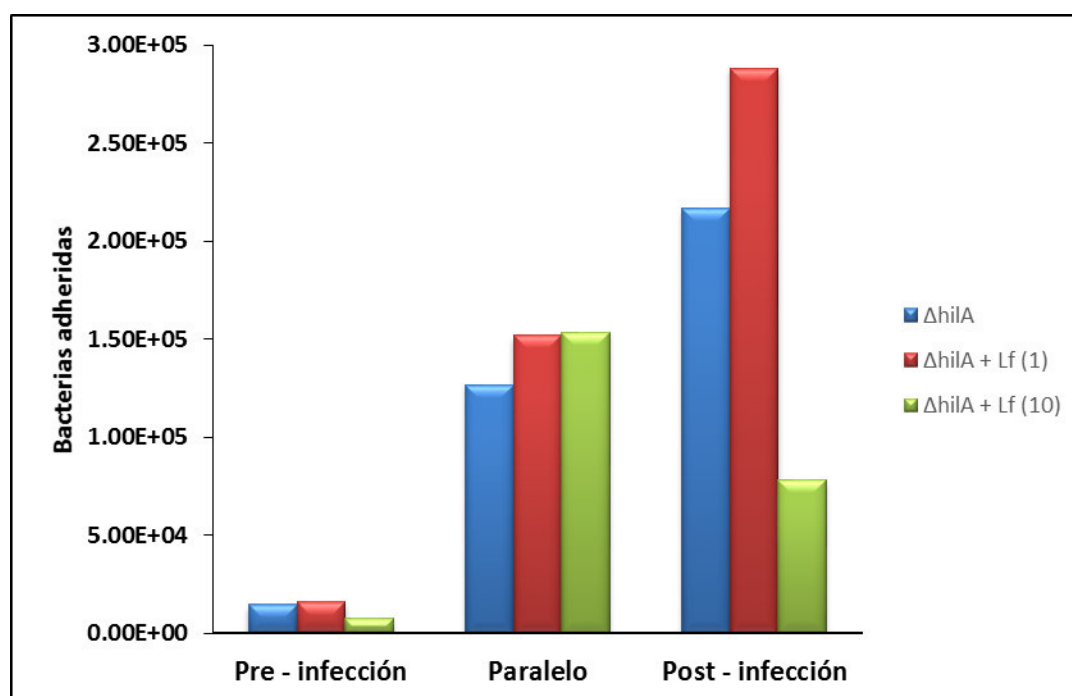


Figura N° 18: Efecto de Lfb en la adherencia de *Salmonella enterica* ser.

Typhimurium SL1344 $\Delta hilA::Kan^r$

4.1.4. Ensayo de Invasión

Las células fueron evaluadas en 3 diferentes tiempos de infección: Pre infección, paralelo y post infección.

Para la evaluación de los tratamientos se tomó en cuenta el crecimiento bacteriano obtenido con *Salmonella enterica* ser. Typhimurium SL1344. En el caso del control negativo (*Salmonella enterica* ser. Typhimurium SL1344 $\Delta hilA::Kan^r$), se evidenció la incapacidad de invasión esta cepa, por lo que no se observó crecimiento de colonias en ningún tratamiento.

Pre-infección: En comparación con el control (sin Lfb), el tratamiento pre-infección mostró que la invasión de *Salmonella* a células HEP-2 disminuyó significativamente (Figura N° 20 y 23). La invasión disminuyó 23% con Lfb

1mg/mL ($28,1 \times 10^4$ UFC/mL vs 21×10^4 UFC/mL, $p = 0,04$) y 50% con Lfb 10 mg/mL ($28,1 \times 10^4$ UFC/mL vs 14×10^4 UFC/mL, $p = 0,04$).

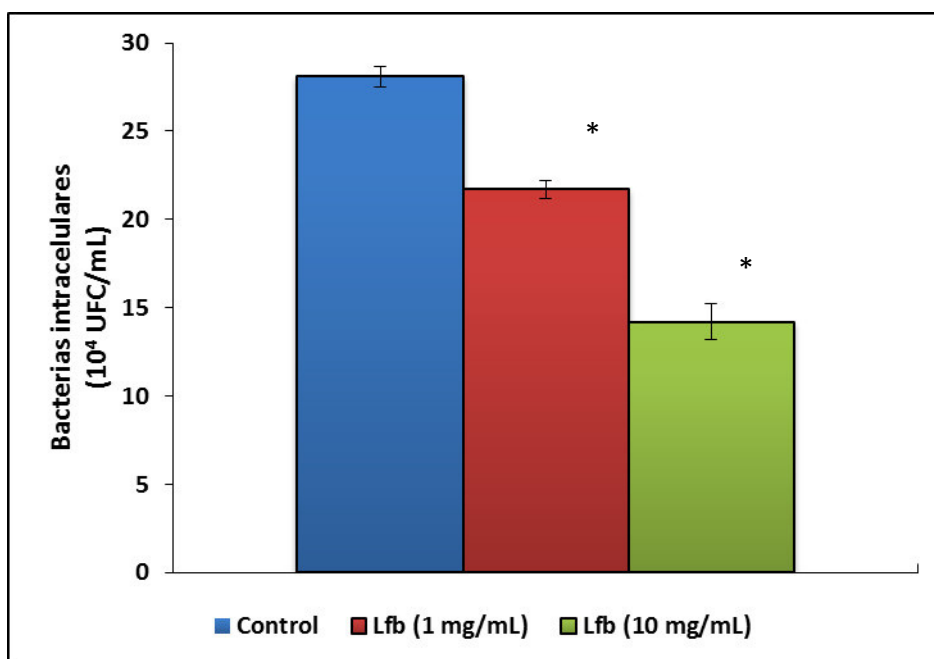


Figura N° 19: Efecto de Lfb en la invasión de *Salmonella* en el tratamiento pre-infección

Paralelo: La invasión disminuyó 49% con Lfb 1 mg/mL (21×10^4 UFC/mL vs 10×10^4 UFC/mL, $p = 0,04$) y el 91% con Lfb 10 mg/mL (21×10^4 UFC/mL vs $1,9 \times 10^4$ UFC/mL, $p = 0,03$) (Figura N° 21 y 23).

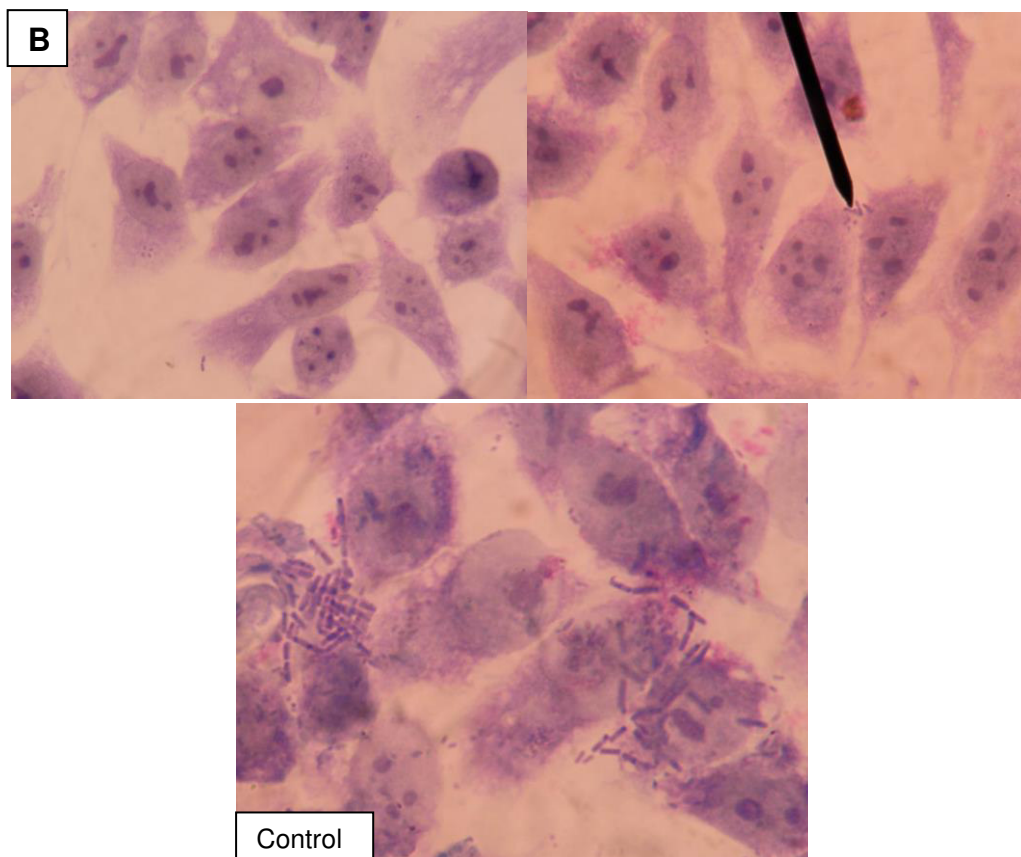
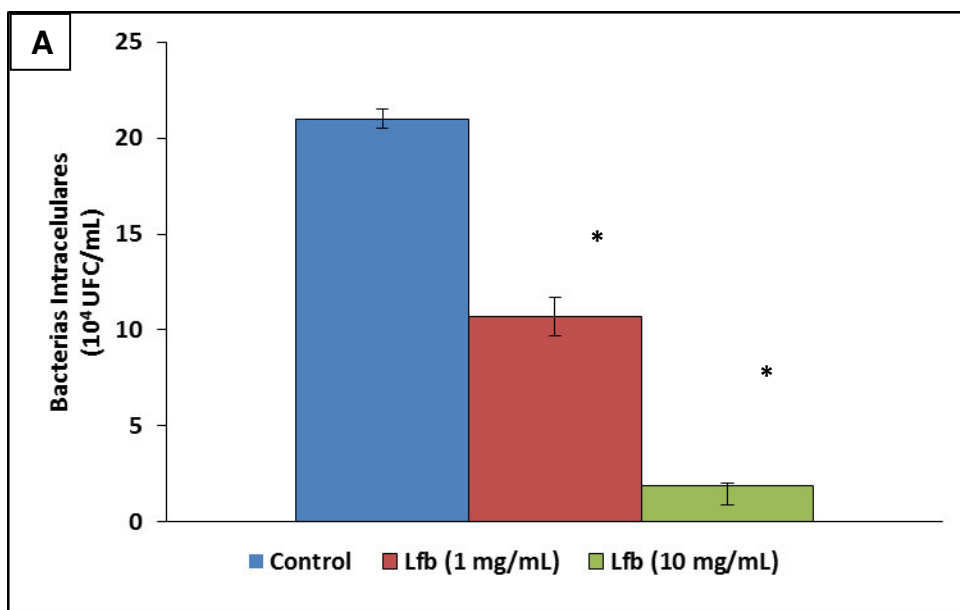


Figura N° 20: Efecto de Lfb en la invasión de *Salmonella* en el tratamiento paralelo. A) Cuantificación de las bacterias intracelulares. B) Células HEp-2 invadidas en el tratamiento con Lfb 10 mg/mL

Post-infección: A diferencia de los casos anteriores, Lfb no disminuyó la invasión de *Salmonella* a las células Hep-2 (Figura N° 22 y 23).

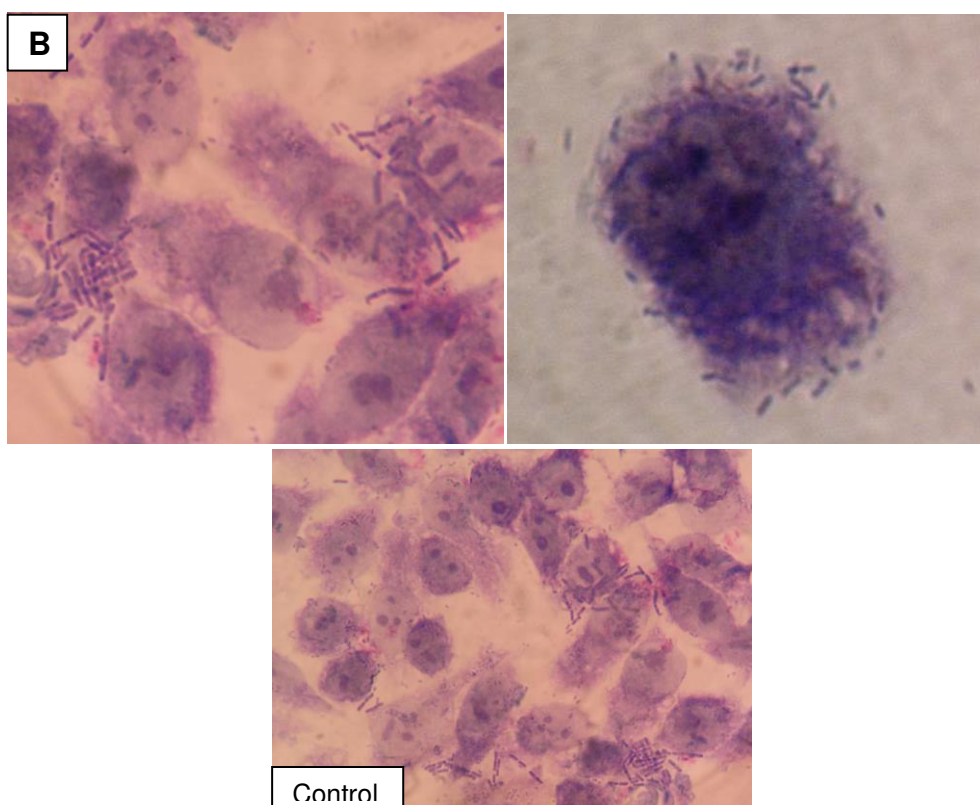
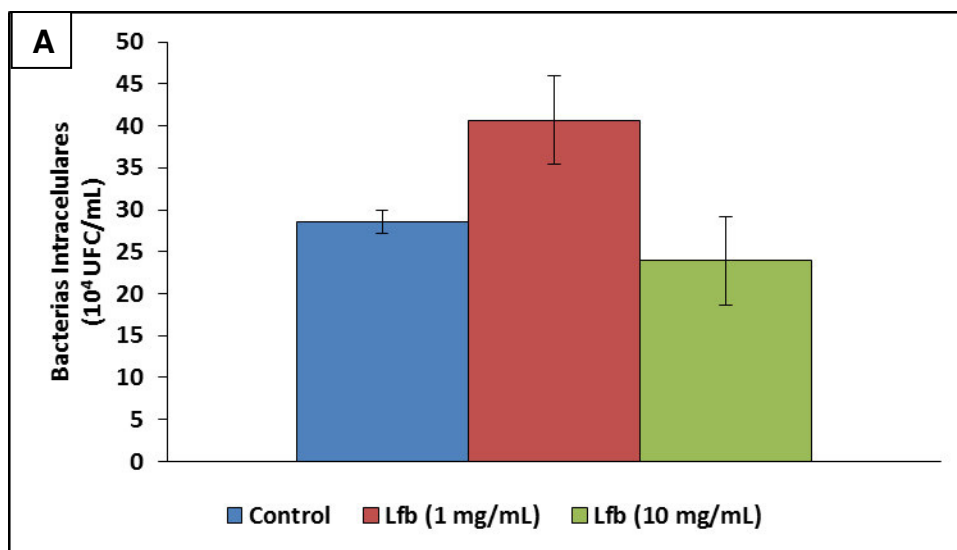


Figura N° 21: Efecto de Lfb en la invasión de *Salmonella* en el tratamiento post-infección. A) Cuantificación de las bacterias intracelulares. B) Células HEp-2 invadidas en el tratamiento con Lfb 10 mg/mL

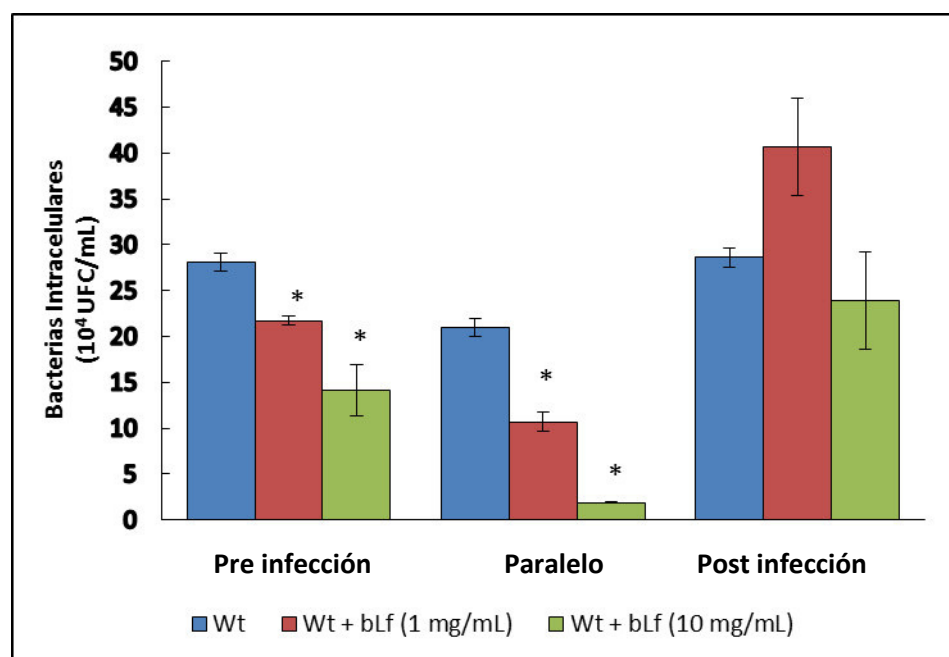


Figura N° 22: Efecto de Lfb en la invasión de *Salmonella*

4.2. Discusión

Se ha demostrado que la lactoferrina tiene actividad antimicrobiana frente a diferentes enteropatógenos. Esta actividad está caracterizada por su efecto bacteriostático, al quelar el hierro, y su efecto bactericida al unirse directamente a la célula generando un incremento en la permeabilidad de la membrana (Coveñas, Dextre, Fernandez, Mosquito, & Ochoa, 2014; Theresa J. Ochoa & Cleary, 2009). Por otra parte, la lactoferrina disminuye la virulencia de algunos de los principales patógenos al disminuir su habilidad de adherirse o invadir las células mamíferas, y al unirse o degradar proteínas de virulencia específicas (Theresa J. Ochoa & Cleary, 2009). Por lo tanto, se podría considerar que la protección contra infecciones de enteropatógenos como *Salmonella* es una actividad biológica plausible relevante de la lactoferrina.

El ensayo de la captación de rojo neutro ("*Neutral red uptake assay*") provee una estimación cuantitativa del número de células viables en un

cultivo, por lo que es una de las pruebas más empleadas en aplicaciones biomédicas y ambientales. Esta prueba se basa en la habilidad de las células viables de incorporar y unirse al colorante rojo neutro (Anexo N° 2). Este colorante catiónico penetra las membranas de las células por difusión pasiva no aniónica y se concentra en los lisosomas, donde se une por enlaces hidrofóbicos electrostáticos a grupos aniónicos y/o fosfato de la matriz lisosomal. Luego, el colorante es extraído de las células viables usando una solución de etanol acidificado, y la absorbancia del colorante solubilizado se cuantifica utilizando un espectrofotómetro. Cuando las células mueren o se reduce la gradiente de pH, el colorante no puede ser retenido; consecuentemente, la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables. En consecuencia, este método permite distinguir entre células viables, dañadas o muertas de acuerdo a su capacidad lisosomal específica de captación del colorante. La integridad lisosomal, con la unión simultánea del colorante rojo neutro, es un indicador muy sensible de la viabilidad celular. El ensayo cuantifica la viabilidad celular y puede ser usado para medir la replicación celular, efectos citostáticos o muerte celular (Repetto et al., 2008). Los resultados obtenidos mediante el ensayo de captación de rojo neutro mostraron que las concentraciones de gentamicina (100 µg y 10 µg) no fueron tóxicas para las células HEp-2.

La cepa *Salmonella enterica* ser. Typhimurium SL1344 Δ hilA::Kan^r se utilizó para evaluar el efecto de la Lfb en la adherencia debido a una mutación presente en esta bacteria, esta mutación se ubica en el gen que regula la secreción de proteína del complejo aguja y por lo que está incapacitada de invadir células; por lo cual los resultados sólo mostraron a las bacterias que se hayan adherido a las células HEp-2. Al evaluar los resultados se observó que hubo inhibición en los tratamientos de pre – infección y post – infección en la concentración de 10 mg/mL de Lfb. Estos resultados coinciden con los hallados por Bessler *et al* 2006, en donde reportaron la capacidad inhibitoria de Lf en células HeLa. Por lo

cual, la inhibición de la adherencia podría deberse a la interacción de Lf con las proteínas de superficie bacteriana (Bessler, de Oliveira, & Giugliano, 2006). Por otro lado, en el caso de Lfb a 1 mg/mL en los 3 tratamientos evaluados, no se observó inhibición. Consideramos la posibilidad de que la concentración evaluada, no fue suficiente para impedir la interacción inicial de la bacteria con la célula. En cultivos celulares, se ha mostrado que Lfb interactúa con las proteínas de superficie de *Salmonella typhimurium* y reduce su habilidad de adhesión a las células huésped (Bessler et al., 2006). Mosquito *et al*, demostraron el efecto protector *in vivo* de la Lfb en la infección de *Salmonella typhimurium* en ratones. El grupo de ratones que fueron infectados con *Salmonella* y recibieron tratamiento con Lfb tuvieron menos mortalidad y signos clínicos típicos de la infección (piloerección, encorvamiento y reducción en el movimiento) así como también disminución del daño en la integridad del epitelio intestinal (Mosquito et al., 2010).

Los estudios de invasión de *Salmonella* han sido llevados a cabo en diversas líneas celulares. La línea HEP-2 es ampliamente usada por su capacidad de reorganizar sus filamentos de c in vitro, lo cual constituye un evento que facilita el fenómeno de invasión inducido por *Salmonella*, en forma similar a como ocurre en el hospedero infectado (Cardona & Sánchez, 2005). El cultivo celular HEP-2 suplementado con gentamicina ha sido utilizado para analizar la invasión; este método fácil y preciso permite el conteo de las bacterias adheridas y las que hayan invadido a la célula (Konkel & Joens, 1989).

En relación a los resultados de la evaluación de la invasión de *S. typhimurium* a células HEP-2, se encontró que Lfb tiene un efecto inhibitorio de la invasión principalmente en la concentración de 10 mg/mL. Los resultados obtenidos en el tratamiento preinfección, sugieren que la inhibición de la invasión se debe al bloqueo de la adhesión e invasión a las células. Estos hallazgos podrían estar relacionados con el estudio de infección de *S. typhimurium*, donde se demostró la interacción de Lf y LPS (S. S. Naidu, Svensson, Kishore, & Naidu, 1993). Estudios *in*

vivo también demostraron que Lfb reduce la mortalidad y signos clínicos producidos por *S. typhimurium* en ratones cuando reciben Lfb antes de la infección (Mosquito et al., 2010). Por esta razón, postulamos la hipótesis que Lfb podría ser su usada como un tratamiento profiláctico para la infección por *Salmonella*.

Por otro lado, en el tratamiento paralelo, encontramos que la inhibición fue considerable (49 y 91%). En este caso, se podría inferir que Lfb puede actuar tanto en los receptores de las células como de la bacteria. Esta doble acción puede explicar el mayor efecto en la protección de la Lfb sobre las células. Por esta razón, proponemos que Lfb podría tener efectos beneficiosos en el tratamiento de estadios tempranos del curso de la infección de *Salmonella*, ya que no tiene un efecto protector después de la infección, es decir cuando la bacteria está establecida e invadido la célula. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que Lfb tiene la habilidad de prevenir la unión de ciertas bacterias a la célula huésped. El mecanismo por el cual Lf inhibe la unión es desconocido, sin embargo se ha sugerido que glicanos de lactoferrina se unen a adhesinas bacterianas, previniendo la interacción con los receptores de la célula huésped (Drago-Serrano, 2006). También se ha demostrado que Lf daña la membrana externa de las bacterias gram negativas mediante una interacción con el LPS (Ellison et al., 1988).

Además Lf se une a muchas células y algunos estudios han demostrado su capacidad de inhibir el ingreso bacteriano a las células (Bessler et al., 2006). El efecto inhibitorio fue reportado en *E. coli* y *S. aureus* y fue relacionado a la habilidad de Lf de unirse a integrinas de las células y glicosaminoglicanos (GAGs) (Di Biase et al., 2004). La unión de Lf a los GAGs de las células parece ser importante en la inhibición de la internalización bacteriana de las células diana. Debido a que Lf puede ser internalizada y localizada en el núcleo, se ha sugerido que la inhibición de la internalización bacteriana puede originarse a partir de regulación de genes o rearreglo del citoesqueleto (Valenti & Antonini, 2005).

La Lf en EPEC y *S. flexneri* bloquea la polimerización de la actina en células epiteliales por la degradación de las proteínas del SST3, el mecanismo del complejo aguja por el cual la bacteria se une e invade a los tejidos huéspedes (Henry F. Gomez et al., 2002; Theresa J. Ochoa et al., 2003). En este contexto, el efecto Lfb en la invasión de *Salmonella* a células HEp-2 puede ser similar al mecanismo de *Shigella*.

No obstante, los resultados obtenidos en el tratamiento post-infección muestran que la Lfb no pudo revertir el proceso de invasión de *Salmonella* a las células HEp-2. Se considera que los resultados obtenidos en el tratamiento post-infección con Lfb a 1 mg/mL se deba a que su concentración de Lfb fue insuficiente para disminuir la invasión, lo cual se evidenció en el incremento de bacterias intracelulares obtenidas en el estudio. Se presume que el periodo de incubación fue suficiente para que la bacteria pueda invadir la monocapa de células HEp-2, por lo tanto, estos resultados sugieren que la administración de Lfb después de ocurrida la infección con *Salmonella*, no ayudaría a controlar y/o disminuir la invasión en ensayos *in vitro*.

En base a estos resultados, debemos resaltar que la lactoferrina tiene un efecto protector sólo cuando se trate de la etapa inicial o en curso de la infección; por esta razón nuestra hipótesis es que la Lfb puede usarse como terapia profiláctica para la infección de *Salmonella*, puesto que se ha reportado que Lfb y Lfh tienen alta homología (aproximadamente 69%) (Pierce et al., 1991).

Debido a que el intestino de los lactantes está impregnado constantemente con Lf, podría tener una relevancia en la protección de infecciones por enteropatógenos. Además, se puede inferir que la Lf puede tener un papel importante como agente profiláctico en brotes o enfermedades de alto riesgo; por lo cual, consideramos que es necesario llevar a cabo estudios para explotar sus beneficios.

V. CONCLUSIONES

1. La lactoferrina bovina reduce la invasión de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 a células HEP-2. La reducción depende de los tratamientos y concentraciones de lactoferrina.
2. La lactoferrina tiene un efecto bacteriostático en la cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 y SL 1344 Δ hilA en la fase exponencial. Este efecto fue revertido al adicionar hierro en el medio.
3. La gentamicina en las concentraciones empleadas en el ensayo de invasión (100 μ g y 10 μ g) no son tóxicas para las células HEP-2.
4. La lactoferrina disminuye la adherencia de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium a células HEP-2 en los tratamientos de pre – infección y post – infección en la concentración de 10 mg/mL.
5. El tratamiento en paralelo en la concentración de 10 mg/mL de lactoferrina permitió una mayor disminución de la invasión (91%) a células HEP-2.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlerova, L., Bartoskova, A., & Faldyna, M. (2008). Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*, 53(9), 457–468.
- Anatolitou, F. (2012). Human milk benefits and breastfeeding. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine (JPNIM)*, 1(1), 11–18.
<https://doi.org/10.7363/010113>
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). Salmonella enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- Antonini, G., Catania, M. R., Greco, R., Longhi, C., Pisciotta, M. G., Seganti, L., & Valenti, P. (1997). Anti-Invasive Activity of Bovine Lactoferrin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 60(3), 267–271.
- Appelmelk, B. J., An, Y. Q., Geerts, M., Thijs, B. G., de Boer, H. A., MacLaren, D. M., ... Nuijens, J. H. (1994). Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infection and Immunity*, 62(6), 2628–2632.
- Barros da Silva, W., & Delizoicov, D. (2008). Reflexiones epistemológicas en las Ciencias de la salud. *Humanidades Médicas*, 8(2–3), 0–0.
- Bessler, H. C., de Oliveira, I. R., & Giugliano, L. G. (2006). Human milk glycoproteins inhibit the adherence of *Salmonella typhimurium* to HeLa cells. *Microbiology and Immunology*, 50(11), 877–882.
- Black, R. E., Morris, S. S., & Bryce, J. (2003). Where and why are 10 million children dying every year? *Lancet (London, England)*, 361(9376), 2226–2234. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13779-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13779-8)

- Brandenburg, K., Jürgens, G., Müller, M., Fukuoka, S., & Koch, M. H. (2001). Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin. *Biological Chemistry*, 382(8), 1215–1225. <https://doi.org/10.1515/BC.2001.152>
- Brock, J. H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 80(1), 1–6.
- Brock, J. H., Arzabe, F., Lampreave, F., & Piñeiro, A. (1976). The effect of trypsin on bovine transferrin and lactoferrin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 446(1), 214–225.
- Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Black, R. E., & WHO Child Health Epidemiology Reference Group. (2005). WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet (London, England)*, 365(9465), 1147–1152. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71877-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71877-8)
- Cabello, R. R. (2007). *Microbiología y parasitología humana / Microbiology and Human Parasitology: Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias / Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*. Ed. Médica Panamericana.
- Cardona, N., & Sánchez, M. (2005). Evaluación de la capacidad de invasión de serovariedades de Salmonella enterica a células Hep-2. *CES Medicina*, 19(2), 7–17.
- Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85(2), 112–118. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>
- Contreras García, C. A. (2010). Asociación de variabilidad genética y fenotípica de Escherichia coli enteropatógena (EPEC) con cuadros de

diarrea en niños menores de un año. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Programa Cybertesis PERÚ*. Recuperado a partir de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/974>

- Coombes, B. K., Coburn, B. A., Potter, A. A., Gomis, S., Mirakhur, K., Li, Y., & Finlay, B. B. (2005). Analysis of the contribution of Salmonella pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infection and Immunity*, 73(11), 7161–7169. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7161-7169.2005>
- Coveñas, C., Dextre, G., Fernandez, D., Mosquito, S., & Ochoa, T. (2014). Effect of bovine lactoferrin biofilms in the formation of clinical strains of enteroaggregative E. coli. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 454–460.
- Crump, J. A., & Mintz, E. D. (2010). Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(2), 241–246. <https://doi.org/10.1086/649541>
- de Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T., & Wiersinga, W. J. (2012). Host–Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathogens*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002933>
- de Oliveira, I. R., de Araújo, A. N., Bao, S. N., & Giugliano, L. G. (2001). Binding of lactoferrin and free secretory component to enterotoxigenic Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters*, 203(1), 29–33.
- Di Biase, A. M., Tinari, A., Pietrantoni, A., Antonini, G., Valenti, P., Conte, M. P., & Superti, F. (2004). Effect of bovine lactoferricin on

enteropathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in HEp-2 cells.

Journal of Medical Microbiology, 53(Pt 5), 407–412.

Drago-Serrano, M. E. (2006). Actividades antibacterianas de lactoferrina.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología, 26(2), 58–63.

Ellison, R. T., & Giehl, T. J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by

lactoferrin and lysozyme. *Journal of Clinical Investigation*, 88(4), 1080–1091.

Ellison, R. T., Giehl, T. J., & LaForce, F. M. (1988). Damage of the outer

membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infection and Immunity*, 56(11), 2774–2781.

Ellison, R. T., LaForce, F. M., Giehl, T. J., Boose, D. S., & Dunn, B. E.

(1990). Lactoferrin and transferrin damage of the gram-negative outer membrane is modulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} . *Journal of General Microbiology*, 136(7), 1437–1446. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-7-1437>

Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>

Farnaud, S., & Evans, R. W. (2003). Lactoferrin--a multifunctional protein

with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40(7), 395–405.

Galán, J. E. (2001). *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion

at work. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 53–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.53>

- Giugliano, L. G., Ribeiro, S. T., Vainstein, M. H., & Ulhoa, C. J. (1995). Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 42(1), 3–9. <https://doi.org/10.1099/00222615-42-1-3>
- Gomez, H. F., Herrera-Insua, I., Siddiqui, M. M., Diaz-Gonzalez, V. A., Caceres, E., Newburg, D. S., & Cleary, T. G. (2001). Protective role of human lactoferrin against invasion of *Shigella flexneri* M90T. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 501, 457–467.
- Gomez, H. F., Ochoa, T. J., Carlin, L. G., & Cleary, T. G. (2003). Human lactoferrin impairs virulence of *Shigella flexneri*. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(1), 87–95. <https://doi.org/10.1086/345875>
- Gomez, H. F., Ochoa, T. J., Herrera-Insua, I., Carlin, L. G., & Cleary, T. G. (2002). Lactoferrin protects rabbits from *Shigella flexneri*-induced inflammatory enteritis. *Infection and Immunity*, 70(12), 7050–7053.
- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(4), 301.e1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>
- Groves, M. L. (1960). The Isolation of a Red Protein from Milk². *Journal of the American Chemical Society*, 82(13), 3345–3350. <https://doi.org/10.1021/ja01498a029>
- Guerrant, R. L., Lima, A. A., Barboza, M., Young, S., Silva, T., Barrett, L., ... Moore, S. (1999). Mechanisms and impact of enteric infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 473, 103–112.

- Hapfelmeier, S., Ehrbar, K., Stecher, B., Barthel, M., Kremer, M., & Hardt, W.-D. (2004). Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infection and Immunity*, 72(2), 795–809.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(1), 53–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(2), 379–433.
- Huicho, L., Trelles, M., & Gonzales, F. (2006). National and sub-national under-five mortality profiles in Peru: a basis for informed policy decisions. *BMC Public Health*, 6, 173. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-6-173>
- Humphries, A. D., Townsend, S. M., Kingsley, R. A., Nicholson, T. L., Tsois, R. M., & Bäumler, A. J. (2001). Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiology Letters*, 201(2), 121–125.
- Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O. (2009). *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. Cellular Microbiology*, 11(11), 1579–1586. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01368.x>
- Johanson, B. (1960). Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chemica Scandinavica*, 14(2), 510–12.

- Jones, G., Steketee, R. W., Black, R. E., Bhutta, Z. A., Morris, S. S., & Bellagio Child Survival Study Group. (2003). How many child deaths can we prevent this year? *Lancet (London, England)*, 362(9377), 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13811-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13811-1)
- Kolyva, S., Waxin, H., & Popoff, M. Y. (1992). The Vi antigen of *Salmonella typhi*: molecular analysis of the *viaB* locus. *Journal of General Microbiology*, 138(2), 297–304. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-2-297>
- Konkel, M. E., & Joens, L. A. (1989). Adhesion to and invasion of HEp-2 cells by *Campylobacter* spp. *Infection and Immunity*, 57(10), 2984–2990.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., ... Aizawa, S. I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5363), 602–605.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I., & Galán, J. E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 10225–10230. <https://doi.org/10.1073/pnas.170128997>
- Lee, C. A., Jones, B. D., & Falkow, S. (1992). Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1847–1851. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1847>

- León-Sicairos, N., & Picos, V. (2010). Lactoferrina: proteína que secuestra hierro en las mucosas. En *La lucha por el hierro patógeno versus hospedero*. (Primera Edición). Mexico: Cinvestav.
- Lima, A. A., Moore, S. R., Barboza, M. S., Soares, A. M., Schleupner, M. A., Newman, R. D., ... Guerrant, R. L. (2000). Persistent diarrhea signals a critical period of increased diarrhea burdens and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1643–1651. <https://doi.org/10.1086/315423>
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., & Finlay, B. B. (2000). Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2(2), 145–156.
- Ministerio de Salud - Dirección General de Epidemiología - Gerencia de Salud Arequipa. (2014). *BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO SEMANAL N° 39*. Bol. Epidemiol. (Arequipa) Vol 1(39) 2014. Recuperado a partir de http://www.saludarequipa.gob.pe/epidemiologia/bole_epi/2014/Bolet_39.pdf
- Montreuil, J., Tonnelat, J., & Mullet, S. (1960). [Preparation and properties of lactosiderophilin (lactotransferrin) of human milk]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 45, 413–421.
- Mosquito, S., Ochoa, T. J., Cok, J., & Cleary, T. G. (2010). Effect of bovine lactoferrin in Salmonella ser. Typhimurium infection in mice. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 23(3), 515–521. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9325-1>

- Naidu, A. S., & Arnold, R. R. (1994). Lactoferrin interaction with salmonellae potentiates antibiotic susceptibility in vitro. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 20(2), 69–75.
- Naidu, S. S., Erdei, J., Czirók, E., Kalfas, S., Gadó, I., Thorén, A., ... Naidu, A. S. (1991). Specific binding of lactoferrin to Escherichia coli isolated from human intestinal infections. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 99(12), 1142–1150.
- Naidu, S. S., Svensson, U., Kishore, A. R., & Naidu, A. S. (1993). Relationship between antibacterial activity and porin binding of lactoferrin in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(2), 240–245.
- Ochoa, T., & Cleary, T. . (2005). *The effects of lactoferrin on type III secretory system and toxin/phage induction virulence mechanisms in Shiga toxin producing E. coli*. Hawai, USA: VII International Lactoferrin Conference.
- Ochoa, T. J., Brown, E. L., Guion, C. E., Chen, J. Z., McMahon, R. J., & Cleary, T. G. (2006). Effect of lactoferrin on enteroaggregative E. coli (EAEC). *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 84(3), 369–376. <https://doi.org/10.1139/o06-053>
- Ochoa, T. J., Cabello, M., Nakamatsu, C., & Cleary, T. G. (2007). *Efecto de lactoferrina bovina en el crecimiento, adherencia e invasividad de Salmonella typhimurium*. Lima, Perú: XVI Jornadas Científicas, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

- Ochoa, T. J., & Cleary, T. G. (2009). Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie*, 91(1), 30–34.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.04.006>
- Ochoa, T. J., Noguera-Obenza, M., & Cleary, T. G. (2004). Lactoferrin blocks the initial host cell attachment mechanism of Enteropathogenic E. coli (EPEC). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 554, 463–466.
- Ochoa, T. J., Noguera-Obenza, M., Ebel, F., Guzman, C. A., Gomez, H. F., & Cleary, T. G. (2003). Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic Escherichia coli. *Infection and Immunity*, 71(9), 5149–5155.
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., & Spik, G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 196(1), 177–184.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Reyes-Reyes, R. ., Manjarrez-Hernández, H. ., & Drago-Serrano, M. E. (2005). El hierro y la virulencia bacteriana. *Enf Inf Microbiol*, 25, 104–107.
- Rodríguez-Franco, D. A., Vázquez-Moreno, L., & Ramos-Clamont Montfort, G. (2005). [Antimicrobial mechanisms and potential clinical application of lactoferrin]. *Revista Latinoamericana De Microbiología*, 47(3–4), 102–111.

- Sallmann, F. R., Baveye-Descamps, S., Pattus, F., Salmon, V., Branza, N., Spik, G., & Legrand, D. (1999). Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin. Binding characteristics and biological effects. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 16107–16114.
- Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 14–56.
- Schraidt, O., & Marlovits, T. C. (2011). Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6021), 1192–1195. <https://doi.org/10.1126/science.1199358>
- Sharma, S., Sinha, M., Kaushik, S., Kaur, P., & Singh, T. P. (2013). C-lobe of lactoferrin: the whole story of the half-molecule. *Biochemistry Research International*, 2013, 271641. <https://doi.org/10.1155/2013/271641>
- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417(6888), 552–555. <https://doi.org/10.1038/417552a>
- Sorensen, M., & Sorensen, M. P. L. (1939). The proteins in whey. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 23, 55–59.
- Valenti, P., & Antonini, G. (2005). Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 62(22), 2576–2587. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5372-0>

- Ward, P. P., Uribe-Luna, S., & Conneely, O. M. (2002). Lactoferrin and host defense. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 80(1), 95–102.
- Waterman, S. R., & Holden, D. W. (2003). Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cellular Microbiology*, 5(8), 501–511.
- Wilson, R. P., Raffatellu, M., Chessa, D., Winter, S. E., Tükel, C., & Bäumler, A. J. (2008). The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of Salmonella. *Cellular Microbiology*, 10(4), 876–890. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01090.x>
- Wu, J., Hu, Y., Du, C., Piao, J., Yang, L., & Yang, X. (2016). The effect of recombinant human lactoferrin from the milk of transgenic cows on Salmonella enterica serovar typhimurium infection in mice. *Food & Function*, 7(1), 308–314. <https://doi.org/10.1039/c5fo00817d>
- Wu, J., Yang, L., Liu, G., Gong, Z., Liu, J., Hu, Y., ... Yang, X. (2013). [Isolation and purification of recombinant human lactoferrin (rhLF) from transgenic rice and its antibacterial activities]. *Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research*, 42(3), 399–404.
- Zhang, X.-L., Jeza, V. T., & Pan, Q. (2008). Salmonella typhi: from a human pathogen to a vaccine vector. *Cellular & Molecular Immunology*, 5(2), 91–97. <https://doi.org/10.1038/cmi.2008.11>

VII. ANEXOS

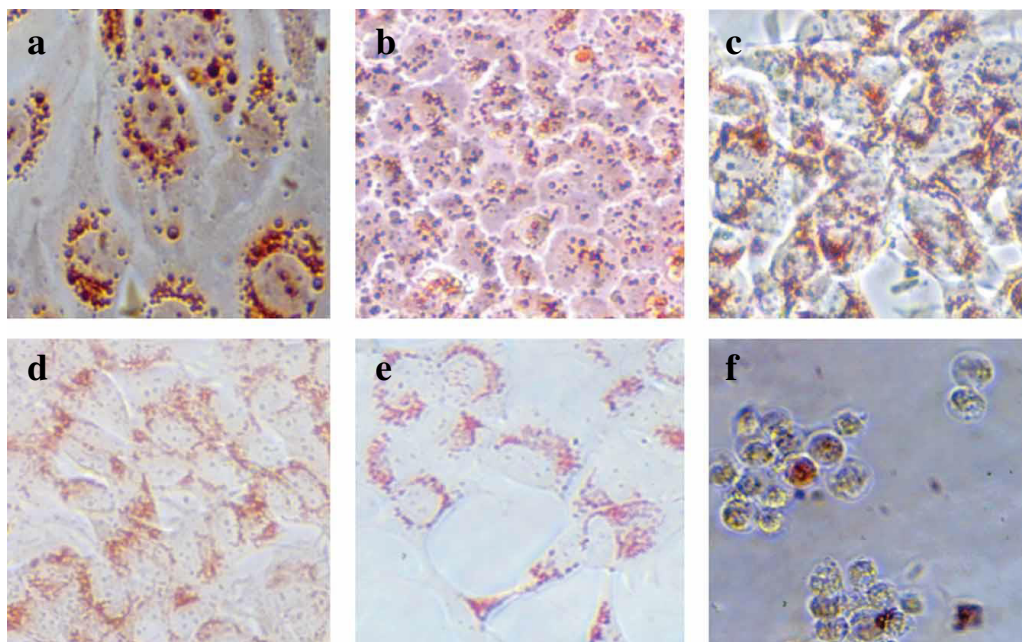
Anexo 1: Matriz de Consistencia

Efecto de la lactoferrina bovina en la invasión de *Salmonella typhimurium* cepa SL 1344 a células HEp-2

PROBLEMAS	OBJETIVOS	JUSTIFICACIÓN	HIPÓTESIS	VARIABLES
<p><u>GENERAL</u></p> <p>Cómo determinar el efecto de la lactoferrina bovina en la invasión de <i>Salmonella typhimurium</i> cepa SL 1344 a células HEp-2.</p> <p><u>ESPECÍFICOS</u></p> <p>1. ¿Cómo determinar el efecto de la lactoferrina bovina en la cinética de crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> cepa SL 1344 y SL 1344 ΔhilA?</p> <p>2. ¿Cómo evaluar el efecto citotóxico del tratamiento con gentamicina a células HEp-2?</p> <p>3. ¿Cómo determinar el efecto <i>in vitro</i> de la lactoferrina en la adhesión de <i>Salmonella typhimurium</i> SL 1344 ΔhilA a células HEp-2?</p> <p>4. ¿Cómo determinar el efecto <i>in vitro</i> de la lactoferrina en la invasividad de</p>	<p><u>GENERAL</u></p> <p>Determinar el efecto de la lactoferrina bovina en la invasión de <i>Salmonella typhimurium</i> cepa SL 1344 a células HEp-2.</p> <p><u>ESPECÍFICOS</u></p> <p>1. Determinar el efecto de la lactoferrina bovina en la cinética de crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> cepa SL 1344 y SL 1344 ΔhilA.</p> <p>2. Evaluar el efecto citotóxico del tratamiento con gentamicina a células HEp-2.</p> <p>3. Determinar el efecto <i>in vitro</i> de la lactoferrina en la adhesión de <i>Salmonella typhimurium</i> SL 1344 ΔhilA a células HEp-2.</p> <p>4. Determinar el efecto <i>in vitro</i> de la lactoferrina en la invasividad de <i>Salmonella typhimurium</i></p>	<p><u>TEÓRICA</u></p> <p>La diarrea es una de las principales causas de muerte de niños en países en vías de desarrollo y las especies de <i>Salmonella</i> son importantes agentes causales de diarrea.</p> <p>La lactoferrina es una proteína presente en la leche materna y se ha comprobado que tiene actividad antibacteriana.</p> <p><u>PRÁCTICA</u></p> <p>Este estudio proporcionará información muy útil sobre el efecto de la lactoferrina bovina en la invasión de <i>Salmonella</i>, la cual representa uno de los patógenos más importantes asociados a diarrea. Asimismo, los hallazgos encontrados en este estudio podrán generalizarse a otras bacterias, y pueden ayudar a comprender mucho mejor el mecanismo que confiere a lactoferrina un poder bacteriostático.</p>	<p><u>GENERAL</u></p> <p>La lactoferrina disminuye la invasión de <i>Salmonella typhimurium</i> cepa SL 1344.</p> <p><u>ESPECÍFICOS</u></p> <p>1. La cinética de crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> cepa SL 1344 y SL 1344 ΔhilA es similar con la lactoferrina.</p> <p>2. El tratamiento con gentamicina a células HEp-2 no es toxico.</p> <p>3. La lactoferrina disminuye la adhesión de <i>Salmonella typhimurium</i> SL 1344 ΔhilA a células HEp-2.</p> <p>4. La lactoferrina disminuye la invasividad de <i>Salmonella</i></p>	<p>VD = Crecimiento de <i>Salmonella</i> VI = Concentración de lactoferrina</p> <p>VD = Toxicidad de gentamicina VI = Células HEp2</p> <p>VD = Adhesión de <i>Salmonella</i> VI = Concentración de lactoferrina</p> <p>VD = Invasión de <i>Salmonella</i> VI = Concentración de lactoferrina</p>

<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1344? 5. ¿Cómo determinar el tratamiento y concentración de lactoferrina que permita mayor disminución de la adherencia e invasión a las células HEP-2?	SL 1344. 5. Determinar el tratamiento y concentración de lactoferrina que permita mayor disminución de la adherencia e invasión a las células HEP-2.		<i>typhimurium</i> SL 1344. 5. Los tratamientos con mayor concentración de lactoferrina permiten mayor disminución de la adherencia e invasión a las células HEP-2.	VD = Invasión y adherencia de <i>Salmonella</i> VI = Tratamiento y concentración de lactoferrina
--	---	--	--	---

Anexo 2: Cultivo de células evaluadas con el ensayo de la captación de rojo neutro.



Morfología de diferentes células **(a)** RTG-2, línea celular de pescado salmónido derivado de gónada de *Oncorhynchus mykiss*. **(b)** PLHC-1 células derivadas de carcinoma hepatocelular del guatapote *Poeciliopsis lucida* **(c)** Línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), y la misma célula humana después de 24 h expuesta a 1 **(d)**, 20 **(e)** y 50 mg ml⁻¹ **(f)** de cloruro de zinc. (Fuente: *Repetto et al., 2008*).